



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO
DE NANOTUBOS FORMADOS POR LA PROTEÍNA VP6 DE
ROTAVIRUS: EXPLORANDO EL CAMINO HACIA UN NUEVO
SISTEMA DE ENTREGA DE MATERIAL GENÉTICO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
MABEL RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑEIRA,
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. JOSÉ MANUEL SANIGER BLESA
CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS	5
Dedicatoria	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	10
1. Introducción	12
1.1 Los sistemas de entrega de ADN	12
1.1.1 Ensayos clínicos utilizando terapia génica	14
1.2 Mecanismos de entrada a la célula y tráfico intracelular de los vectores no virales	17
1.2.1 Endocitosis dependiente de clatrina	18
1.2.2 Endocitosis dependiente de caveolina	19
1.2.3 Macropinocitosis	20
1.2.4 Fagocitosis	21
1.2.5 Inhibidores de endocitosis	21
1.3. Los rotavirus	23
1.3.1 La proteína VP6 de rotavirus	24
2. Justificación	29
3. Hipótesis y Objetivos	31
3.1 Hipótesis	31
3.2 Objetivo general	31
3.3 Objetivos específicos	31
4. Materiales y Métodos	32
4.1 Clonación del gen de EGFP en el vector pVAX1	33
4.1.1 Obtención del gen de la EGFP	33
4.1.2 Subclonación del gen de EGFP en el vector pVAX1	35
4.2 Producción y purificación de los nanotubos de VP6	36
4.3 Cultivo celular	37
4.4 Producción del AcM 255/60	38
4.5 Ensayos de citotoxicidad de los nanotubos de VP6	39
4.6 Ensayos de citotoxicidad de los inhibidores de la endocitosis Metil- β -ciclodextrina y Genisteína en células THP1 y J774	39
4.7 Internalización de los nanotubos de VP6 en células de mamífero	40
4.8 Inhibición de la entrada de los nanotubos de VP6 a macrófagos en presencia de inhibidores de la endocitosis.	40
4.9. Reensamblaje de VP6 en presencia del plásmido pVAX1-EGFP	41
4.9.1. Digestión del ADN plasmídico con Benzonasa	41
5. Resultados	42
5.1. Obtención del plásmido pVAX1-EGFP	42

5.2 Producción y purificación de los nanotubos de VP6	45
5.3 Citotoxicidad de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero	48
5.4 Internalización de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero	49
5.5 Citotoxicidad de los inhibidores de endocitosis M β CD y genisteína sobre las líneas celulares THP1 y J774.	58
5.6 Internalización de los nanotubos de VP6 en presencia de inhibidores de la endocitosis metil- β -ciclodextrina y genisteína	60
5.7 Ensayos para encapsular ADN en el interior de los nanotubos de VP6	68
5.8 Reensamblaje de nanotubos de VP6 con NaHCO ₃	71
6. Discusión	73
7. Conclusiones	82
8. Perspectivas	83
9. Referencias Bibliográficas	84
10. Productos generados	93
10.1 Artículos arbitrados	93
10.2 Participación en congresos nacionales e internacionales	93
Anexo I	94

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACYT, y de los proyectos CONACYT-Salud 2007 c01-69911, PAPIIT-UNAM IN-206407, PAPIIT-UNAM IN-224409, SEP-CONACYT 101847 y PAPIIT-UNAM IT-200113. Se agradece el apoyo técnico de la M. en C. Vanessa Hernández y de la M. en C. Ana Ruth Pastor, Dra. Guadalupe Zavala (Unidad de Microscopia, IBT, UNAM), M. en C. Alba Neri Lecona (Unidad de Microscopia Electrónica, INSP), Dr. Christopher Wood y Dr. Arturo Pimentel (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT, UNAM), Dra. Yvonne Rosenstein y Dra. Claudia Treviño (IBT, UNAM), Dra Adriana Valdez (IIB, UNAM). Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (IBT, UNAM). B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth, Biblioteca del IBT, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares por haberme aceptado en su grupo y por transmitirme sus conocimientos y experiencia. Gracias por las revisiones, los consejos y por tu amistad.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por abirme las puertas de su laboratorio y por todos los consejos y sugerencias experimentales.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Enrique Rudiño y Dr. José Saniger. Muchas gracias por su tutoría y sus sugerencias que siempre fueron valiosas.

A los miembros del Jurado: Dra. Yvonne Rosenstein, Dr. Gerardo Corzo, Dr. Fernando Esquivel, Dr. Tomás López y Dra. Angélica Meneses. Gracias por tomarse el tiempo de revisar el trabajo y por todas las sugerencias que ayudaron a enriquecerlo.

Al Dr. Christopher Wood por dedicarme su tiempo para la adquisición de imágenes.

Al Dr. Arturo Pimentel por la ayuda con el procesamiento y análisis de imágenes.

A la Dra Yvonne Rosenstein por facilitarnos la línea THP1 y por sus valiosos comentarios y sugerencias experimentales.

Al M. en C. Alvaro Torres por su ayuda con el cultivo de células THP1.

Al Dr. Tomás López por facilitarnos la línea celular CaCo-2 y por su ayuda con el cultivo celular.

A la Dra Claudia Treviño por facilitarnos los inhibidores de endocitosis.

A la Dra. Adriana Valdez por facilitarnos la línea celular J774. Muchas gracias también por tu valiosa amistad.

Al M. en C. Ricardo Castro, miles de gracias por tu ayuda experimental.

A la Dra. Rosana Sánchez por los innumerables consejos y ayuda experimental.

A la Dres Lilí Gallo y Germán Plascencia. Muchas gracias por las sugerencias y consejos experimentales.

A la Lic. Karin Levy por el apoyo administrativo y logístico.

A todos mis compañeros del Grupo Palomares-Ramírez, cuyos comentarios, sugerencias y preguntas enriquecieron mi trabajo.

A todos los integrantes del Grupo Galindo por su compañerismo.

Gracias por la amistad y el apoyo: Merinín, Rosana, Ricardo, Liliana, Lilí, Ramón, Esteban, Enrique, Ioatzin, Adry, Mau y Arturin.

A mi familia.

A todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Dedicatoria

Este trabajo y todo el esfuerzo realizado está dedicado a Karel y a mis hijos, quienes son el motor impulsor de mi vida. También lo dedico a mis padres adorados por su infinita ayuda y su amor incondicional.

Abreviaturas

AcM: Anticuerpo monoclonal

BSA: Albúmina de suero bovino

DAG: Diacilglicerol

DDL: Dispersión dinámica de luz

DLP: Partícula de doble capa

LNMA: Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada

M β CD: Metil- β -Ciclodextrina

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MPM: Marcador de peso molecular

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

OVA: Ovoalbúmina

PBS: Solución tampón salina de fosfatos

PEI: Polietilenimina

PKC: Protein quinasa C

PMA: Forbol 12-miristato 14-acetato

PPVs: Partículas pseudovirales

SD: Sin digerir

SFB: Suero fetal bovino

SN: Sobrenadante

TEM: Transmission electron microscopy

Resumen

A lo largo de la última década se ha incrementado considerablemente el número de publicaciones que muestran avances en el campo de la nanotecnología. Las aplicaciones de las nanoestructuras van desde propiedades catalíticas, magnéticas y eléctricas hasta su capacidad de ser acarreadores de fármacos o ácidos nucleicos. Entre esas estructuras se encuentran las proteínas que conforman las cápsides virales, las cuales tienen la propiedad de autoensamblarse cuando son expresadas de manera recombinante, formando partículas pseudovirales que presentan dimensiones similares a los virus. Entre las proteínas de cápside de virus mejor estudiadas se encuentra la proteína VP6 de rotavirus, la cual presenta un polimorfismo estructural que le permite autoensamblarse en forma de tubos o de esferas en dependencia de las condiciones de pH y fuerza iónica del medio. En nuestro grupo la producción y purificación de los nanotubos de VP6 con un alto grado de pureza utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus, ha permitido explorar sus aplicaciones en el campo de la nanotecnología y la inmunología. Sin embargo, a pesar de los reportes que muestran la ventaja de las estructuras tubulares como acarreadores de fármacos debido a su mayor volumen interno, no se ha estudiado la capacidad de los nanotubos de VP6 como acarreadores de moléculas. Con el objetivo de explorar nuevas capacidades de los nanotubos de VP6 nos propusimos en el presente trabajo estudiar sus propiedades como agentes acarreadores de ácidos nucleicos, teniendo en cuenta que muchos de los sistemas de entrega de material genético que se han evaluado recientemente en ensayos clínicos han mostrado efectos adversos severos.

Como un primer paso en el estudio de nuevas propiedades de los nanotubos de VP6 estudiamos su efecto sobre el crecimiento de diferentes líneas celulares de mamífero. Nuestros resultados mostraron la baja toxicidad de los nanotubos de VP6 al ser adicionados a las líneas celulares de mamífero HEK-293, CaCo-2, COS-7, THP1 y J774, condición indispensable que debe cumplir cualquier sistema de entrega de material genético. Los nanotubos de VP6 fueron además internalizados de forma específica por las líneas de macrófagos THP1 y J774, y este proceso dependió del ensamblaje de VP6 en estructuras tubulares, ya que la proteína desnaturalizada o formando partículas pseudovirales de doble capa esféricas no fue endocitada por los macrófagos en las condiciones analizadas. Este resultado contribuye a entender la alta inmunogenicidad de los nanotubos de VP6, los

cuales inducen una mayor respuesta de anticuerpos contra rotavirus que las partículas pseudovirales de doble capa, sugiriendo que el tamaño de los nanotubos de VP6 (alrededor de 1 micrómetro de longitud) influye en sus propiedades inmunogénicas. Mediante el uso de inhibidores de endocitosis como la M β CD y la genisteína en los ensayos de internalización de los nanotubos de VP6 en macrófagos sugerimos que este proceso depende de la presencia de colesterol en la membrana plasmática de las células.

Para encapsular ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6, estos se desensamblaron mediante la adición de CaCl₂ al medio. El reensamblaje de los tubos se realizó con una técnica que fue desarrollada en este trabajo, y que consiste en eliminar el calcio de la solución en presencia de ADN plasmídico mediante diafiltración. A pesar de ensayar diferentes soluciones tampón en ningún caso logramos encapsular plásmidos en el interior de los nanotubos de VP6 ya que la adición de nucleasas a la mezcla VP6-ADN no protegió a este último de la degradación enzimática. Una posible explicación a este fenómeno es la insuficiencia de cargas positivas en los aminoácidos orientados hacia la luz de los nanotubos de VP6, los que podrían interactuar con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, favoreciendo así la encapsulación del ADN. Por otra parte, las características propias del ADN plasmídico, como su rigidez conformacional, pueden contribuir a que el tamaño del plásmido sea demasiado grande o a que su grado de superenrollamiento no sea suficiente para encapsularse en el lumen de los nanotubos de VP6. Para corroborar esta hipótesis, sugerimos que se realicen ensayos de encapsulación con ADN lineal o con pequeñas moléculas como oligonucleótidos.

Este trabajo constituye el primer reporte sobre la interacción de nanotubos de VP6 con células de mamífero y abre el camino hacia el desarrollo de un nuevo sistema de entrega de moléculas específico por células del sistema inmune.

Abstract

In the last decade the number of publications referring to nanotechnology increased considerably. Nanostructures exhibit catalytic, magnetic and electric properties among others, and have been used to encapsidate pharmaceuticals and nucleic acids. Nanostructures can be composed by virus capsid proteins, which have the ability to self-assemble when recombinantly expressed, forming virus-like particles that maintain the same dimensions as the original virus.

VP6 is one of the proteins that form the rotavirus capsid. It has polymorphic features: it assembles in the form of nanotubes or icosahedra, depending on the ionic strength and the pH of the medium. Using the insect-cell baculovirus system, we expressed VP6, which assembles in the form of nanotubes inside insect cells. Using a simple and reproducible protocol, we were able to purify the nanotubes with a high degree of purity. VP6 nanotubes were highly immunogenic when administered to mice, and also have been used as templates for the production of metal nanoparticles. Nevertheless, the ability of VP6 nanotubes to encapsidate molecules have remained unknown in spite of the reports that highlight the advantages of using nanotubular structures as delivery vehicles due to their high aspect ratio. The main goal of our work was to study new properties of VP6 nanotubes, such as their interaction with cells and their ability to encapsidate nucleic acids. Other viral capsid proteins such as those from papilloma virus, nodavirus, SV40, CMV, TMV and dengue virus have been successfully used to encapsidate and deliver nucleic acids to cultured cells.

As a first step, we evaluated the cytotoxicity of VP6 nanotubes when added to the mammalian cell lines HEK-293, CaCo-2, COS-7, THP1 and J774. Our results showed that at the concentrations analyzed VP6 nanotubes were not toxic to any of the mammalian cells tested, which is an indispensable feature of a delivery vehicle. VP6 nanotubes were specifically internalized inside THP1 and J774 macrophages, a process that seemed to depend on the arrange of VP6 in the form of nanotubes because when denatured VP6 protein or icosahedral virus-like particles formed by VP2 and VP6 were added to the cells, no internalization of VP6 was observed. These results probably explain why VP6 nanotubes are more immunogenic and confer a higher protection against rotavirus infection in mice than spherical doubled layered particles (VP2/VP6) or VP6 trimers. Experiments with the

endocytosis inhibitors M β CD and genistein during internalization suggest that the uptake of VP6 nanotubes by macrophages depended of the presence of cholesterol in the plasma membrane and is not mediated by the activity of Tyr-kinases.

In order to encapside plasmids inside VP6 nanotubes, we disassembled the nanotubes by the addition of CaCl₂. Unassembled VP6 was reassembled in the presence of a plasmid by removing calcium by diafiltration, a protocol developed by us. The addition of the nuclease Benzonase degraded the plasmid, which was visualized by electrophoresis and ethidium bromide staining, showing that we were not able to encapsidate DNA inside VP6 nanotubes even when various buffers at different pH were tested. When the mixtures DNA-VP6 nanotubes were analyzed using TEM, an interaction of the DNA and the external surface of the nanotubes was visualized at pH8. The lack of enough positive charges in the internal surface of VP6 nanotubes may be a factor that impairs the encapsidation of DNA. Moreover, the intrinsic features of plasmids, such as their stiffness and highly charged negative surface, may impair their encapsidation inside nanotubes. As an alternative, we propose to perform the encapsidation assays using smaller DNA molecules, such as oligonucleotides.

This work is the first report of the interaction of VP6 nanotubes with cells and opens a path to explore VP6 nanotubes as a delivery system to macrophages. The specificity of the interaction of VP6 nanotubes with macrophages can also be exploited to develop new immunogens against rotavirus disease.

1. Introducción

1.1 Los sistemas de entrega de ADN

La entrega de ADN plasmídico al interior celular para facilitar la expresión *in situ* de proteínas se lleva a cabo utilizando diferentes métodos como la electroporación, la inyección, la transfección con lípidos catiónicos, la infección con virus o recientemente, utilizando nanomateriales (Al Dosari y Gao, 2009). La electroporación consiste en la generación de un campo eléctrico *in vivo* o *in vitro* que altera la permeabilidad de la membrana plasmática, generando poros que permiten la migración electroforética del ADN al interior celular. Con este método pueden obtenerse eficiencias de transfección comparables con el uso de vectores virales (Andre y Mir, 2004). La inyección intramuscular de ADN desnudo se reportó por primera vez en 1990 (Wolff et al., 1990), y desde entonces se ha utilizado en diversas terapias, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades visuales mediante la administración intraocular de virus adenoasociados (Willett y Bennett, 2013) o para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares mediante la inyección de ADN en la vasculatura cardíaca (Pal y Kofidis, 2013). Los lípidos catiónicos poseen una estructura común: generalmente una amina primaria, secundaria o terciaria que comprende la cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica compuesta por cadenas de ácidos grasos alifáticos o colesterol. La cabeza hidrofílica establece interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos y con glicoproteínas de la membrana celular. Los lípidos catiónicos se han utilizado eficientemente para entregar ácidos nucleicos, sin embargo suelen ser tóxicos y al ser administrados *in vivo* se unen a proteínas del suero formando agregados que se eliminan rápidamente de la circulación, además de inducir potentes respuestas anti-inflamatorias en el hospedero (Liu et al., 1997; Yew et al., 2000).

Los vectores virales también son utilizados como sistema de entrega de material genético, y pertenecen a las familias de Oncovirus, Lentivirus, Virus Adenoasociados, Adenovirus y Herpes virus. El uso de virus como acarreadores de genes ha demostrado ser muy eficiente. No obstante, al ser patógenos naturales han causado en algunos casos efectos adversos (a veces la muerte) a pacientes en ensayos clínicos (Thomas et al., 2003). Estos efectos adversos comprenden fiebre, daño en el hígado, diseminación de la coagulación

Introducción

intravascular y fallo generalizado de órganos debido a la inducción de una respuesta inflamatoria exacerbada como consecuencia de la terapia. El mensaje más importante que conlleva este hecho es que resulta esencial entender en detalle la farmacocinética y la biología de los sistemas de entrega de material genético.

En reportes recientes se ha mostrado el desarrollo de sistemas de entrega de material genético basados en agentes no infecciosos como los polímeros inertes (polietilimina, quitosan y alginato), los nanotubos de carbono y las partículas pseudovirales (PPVs), las cuales son cápsides virales autoensambladas que no poseen capacidad replicativa (Touze et al., 1998; Pantarotto et al., 2004; Kumar et al., 2008; Al Dosari y Gao, 2009). Los nanotubos en particular tienen la ventaja de poseer una alta capacidad de carga y la posibilidad de modificar su superficie interna para favorecer la interacción con determinadas biomoléculas (Hillebrenner et al., 2006). Chen y colaboradores en 2005 utilizaron nanotubos de alúmina modificados con sílica para encapsular plásmidos codificantes para la proteína verde fluorescente (GFP). Mediante experimentos de cultivo celular, demostraron que células COS-7 fueron capaces de internalizar del 60 al 70% de estos tubos, probablemente mediante mecanismos de endocitosis. Entre un 10 y un 20% de las células que internalizaron los tubos fueron capaces de expresar la GFP en su interior. Los nanotubos de carbono también se han usado con éxito para la entrega de material genético al interior de células de mamífero en ensayos *in vitro*. En este caso se han funcionalizado con amonio o con lisina para permitir la interacción con los fosfatos del ADN (Singh et al., 2005).

Recientemente, los hidrogeles sensibles al pH como el alginato y el quitosan, se han utilizado para la entrega de fármacos peptídicos por vía oral. El alginato es un polisacárido lineal soluble en agua compuesto por ácido glucurónico y ácido manurónico, y el quitosan está formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina. Debido a sus propiedades químicas, ambos tienen la capacidad de adherirse a las mucosas (George et al., 2006). Las nanopartículas formadas por el quitosan se utilizaron para la encapsulación de una vacuna de ADN que codifica para la porina OMP38 del *Vibrio anguillarum*. Esta porina fue expresada en células de riñón de róbalo cultivadas *in vitro* transfectadas con la preparación quitosan-ADN. La inmunización oral del róbalo asiático *Lates calcarife* con

esta preparación, generó respuesta humoral protectora contra el microorganismo en el 50% de los peces inmunizados (Kumar et al., 2008).

El ADN plasmídico también ha sido encapsulado en el interior de partículas pseudovirales. Tal es el caso de la encapsulación de ADN en PPVs formadas por la proteína de cápside del virus de papiloma humano L1 (Touzé y Coursaget, 1998). Al transfectar células HeLa con esta preparación de PPVs:ADN, el 70% de las mismas expresaron la GFP codificada por los plásmidos. PPVs formadas por la proteína VP1 del virus SV40 también han sido utilizadas con éxito para la entrega de ADN plasmídico en las células linfoblastoides .45 y K562 (Kimchi-Sarfaty et al., 2002). La línea celular de insecto Sf9 ha sido transfectada con éxito utilizando PPVs de nodavirus producidas en *E. coli*. Mediante ensayos de desensamblaje y reensamblaje de las PPVs en presencia de ADN plasmídico se ha logrado encapsular a este último y entregarlo a las células de insecto con una eficiencia de transfección del 95% (Jariyapong et al., 2014).

Para promover la encapsulación del ADN dentro de las PPVs se han utilizado diferentes métodos como el desensamblaje y reensamblaje de las PPVs en presencia del ADN o mediante choque osmótico (Touzé et al., 2001). Un factor que modula la eficiencia de la transfección de moléculas de ADN a células en cultivo es el tamaño de los plásmidos, siendo los más pequeños mucho más eficientes (Kreiss et al., 1999). El tamaño de los plásmidos transfectados a células en cultivo también influye en el nivel de expresión de proteínas recombinantes. Yin y colaboradores (2005) mostraron que el nivel de expresión de luciferasa en la línea de leucemia eritrocítica humana K562 en cultivo disminuyó en función del aumento en el tamaño de los plásmidos codificantes para dicha proteína.

1.1.1 Ensayos clínicos utilizando terapia génica

Hasta el momento se han realizado o están en curso 1996 ensayos clínicos que involucran la entrega de material genético a humanos, sin embargo ninguno de los productos evaluados ha sido aprobado por la FDA para su comercialización (Ginn et al., 2013; fda.gov). De estos ensayos, el 81.5% ha estado dirigido a terapias contra cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades hereditarias monogénicas, destacándose entre este último grupo la fibrosis quística y las inmunodeficiencias combinadas. En la siguiente figura se

muestran los vectores tanto virales como no virales que han sido utilizados hasta la fecha en ensayos clínicos en humanos.

Como se observa en la Figura 1, la administración de ADN desnudo es la variante más utilizada en los ensayos clínicos que no involucran vectores virales (17.8 % de los ensayos), seguida del uso de los lípidos catiónicos como sistema de entrega de ADN (5.5%).

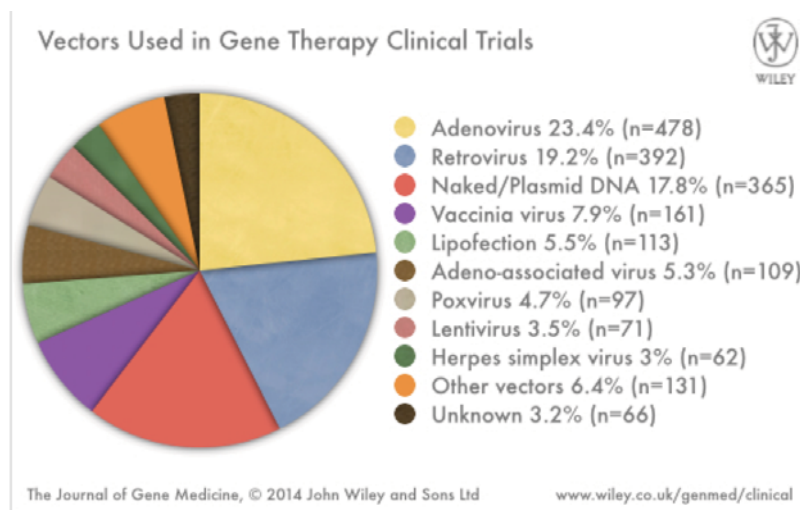


Fig. 1. Vectores utilizados en ensayos clínicos para terapia génica (<http://www.abedia.com/wiley/images/1401vectors.jpg>).

En China se comercializan dos productos que utilizan terapia génica: Gendicine y Oncorine, producidos por la compañía Shenzhen SiBiono GeneTech. Gendicine está compuesto por partículas virales de adenovirus tipo 5 que acarrean el gen de p53, el cual es un supresor tumoral. Las partículas adenovirales se producen en la línea celular SBN-Cel, la cual fue subclonada a partir de células HEK-293. Esta preparación se ha utilizado para tratar carcinoma escamoso de cabeza y cuello y se encuentra en prueba en ensayos clínicos para tratar otros tipos de tumores. Oncorine es un adenovirus tipo 5 modificado genéticamente para replicarse en células tumorales deficientes de p53, por tanto su acción es tumoricida (<http://www.gelifesciences.com>; <http://www.rsc.org>). En Europa se aprobó la aplicación de Glybera®, la cual se utiliza para entregar el gen de la lipasa lipoproteica (LPL) que permite la metabolización de los quilomicrones. Este fármaco contiene un virus adenoasociado tipo-1 que carece de capacidad replicativa y que acarrea el gen de LPL. En octubre de 2012, la Comisión Europea aprobó la aplicación de Glybera® bajo

Introducción

circunstancias excepcionales como tratamiento en pacientes adultos diagnosticados con una deficiencia de LPL que sufren de pancreatitis crónica (<http://www.uniquire.com>).

Los vectores virales siguen siendo los más utilizados en los ensayos clínicos para terapia génica, destacándose entre ellos los adenovirus y los retrovirus. Los adenovirus son los vectores más eficientes para la entrega de material genético al núcleo, y la inyección directa de adenovirus puede transducir la mayor parte de los tejidos (Gerdes et al., 2000). Las primeras generaciones de vectores adenovirales que se utilizaron para terapia génica inducían fuertes respuestas citotóxicas que desencadenaban una rápida eliminación del transgen (Lusky et al., 1998), por ello estos virus han sido ingenierizados a lo largo del tiempo con el fin de minimizar su inmunogenicidad. El desarrollo de adenovirus “helper-dependent” (HD-Ads), en los que se han eliminado todos los genes virales, ha disminuido la inmunogenicidad de estos vectores y ha permitido una expresión más prolongada del transgen (Segura et al., 2008).

Los retrovirus han experimentado un retroceso en los últimos años como una alternativa segura para combatir deficiencias genéticas debido a la aparición de efectos adversos en pacientes. En el año 2000 se reportó el desarrollo de leucemia de células T en 5 de 20 infantes que fueron tratados por padecer el síndrome de inmunodeficiencia combinada asociada al cromosoma X (SCIC-X1), los cuales fueron transfundidos con células madre hematopoyéticas transfectadas con un retrovirus que contenía el gen que codifica para la cadena γ del receptor de citocinas. Esta proteína forma parte de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21. En estos pacientes se detectó la presencia una mutación insercional causada por el retrovirus cerca del promotor del oncogen LMO2 que derivó en una expresión aberrante del mismo (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; 2003b). Estos reportes y otros han preocupado a la comunidad científica de tal forma que se ha incrementado la búsqueda de sistemas de entrega de ADN que no involucre vectores virales.

1.2 Mecanismos de entrada a la célula y tráfico intracelular de los vectores no virales

Una de las desventajas de los vectores no virales es su baja eficiencia de transfección cuando se comparan con los virus, los cuales han evolucionado para aprovechar al máximo la maquinaria celular, garantizando así su supervivencia. Esta baja eficiencia de transfección está relacionada a una menor frecuencia de penetración en la célula así como a una menor capacidad del ADN internalizado de escapar de la maquinaria degradadora celular para alcanzar el núcleo (Bally et al., 1999). El principal mecanismo descrito para la internalización celular de vectores no virales es la endocitosis, la cual a su vez engloba varias rutas de entrada de moléculas al interior celular (Figura 2). Los mecanismos de endocitosis se dividen en dos grandes grupos: la fagocitosis, la cual está restringida en mamíferos a células especializadas del sistema inmune (fagocitos) y la pinocitosis, que se presenta en todos los tipos celulares. La pinocitosis comprende la endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina, endocitosis independiente de clatrina y caveolina y la macropinocitosis, en la cual se endocitan solutos extracelulares de manera inespecífica (Conner y Schmid, 2003).

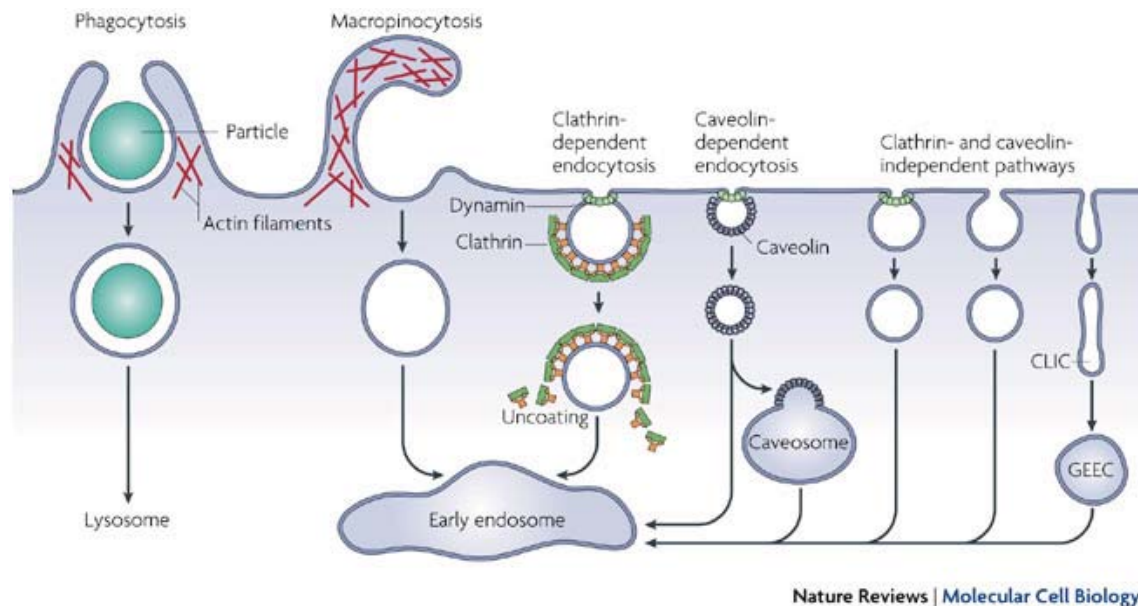


Fig.2. Mecanismos de endocitosis. Las partículas de mayor tamaño entran a la célula por fagocitosis mientras que la internalización de fluido ocurre mediante macropinocitosis. Ambos procesos dependen de la remodelación del citoesqueleto de actina. Comparado con el resto de las vías endocíticas, el largo de las vesículas formadas durante la fagocitosis y la macropinocitosis es mayor. Numerosas moléculas pueden ser endocitadas por mecanismos independientes de clatrina y de la GTPasa dinamina. La mayoría de las moléculas internalizadas son enviadas a los endosomas tempranos a través de vesículas cubiertas de clatrina o de caveolina, o a través de intermediarios tubulares conocido como transportadores independientes de clatrina y caveolina (CLICs), los cuales se derivan de la membrana plasmática. Algunas moléculas son enviadas primeramente a compartimentos intermedios como los caveosomas o compartimentos endosomales tempranos enriquecidos con proteínas ancladas a fosfatidil inositol (GEEC) antes de su llegada a los endosomas tempranos. **Tomado de Mayor y Pagano, 2007.** Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 185–194.

1.2.1 Endocitosis dependiente de clatrina

La endocitosis dependiente de clatrina (CME, por sus siglas en inglés) es la ruta de entrada mejor caracterizada de todas, y los ejemplos clásicos en la literatura incluyen la entrada de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de la transferrina mediante unión a sus receptores respectivos. En esta ruta de entrada los complejos ligando-receptor se concentran en regiones de la membrana cubiertas internamente por clatrina y proteínas adaptadoras, las cuales tensan la membrana plasmática de manera que ésta se invagina y se forma una vesícula endocítica que es posteriormente separada de la membrana celular mediante la acción enzimática (Takei y Haucke, 2001). Las vesículas liberadas se caracterizan por presentar una cubierta de clatrina distribuída en la superficie en un arreglo poligonal y presentan un diámetro que oscila entre los 150 y los 200 nm. Una vez que se despega la cubierta de clatrina de la vesícula, ésta se convierte en un endosoma temprano, el cual tiene un pH aproximado de 6. El endosoma puede fusionarse con otros endosomas para formar los endosomas tardíos, que se convierten en lisosomas, en los cuales el pH está alrededor de 5 (Maxfield y McGrow, 2004). En el interior de los endosomas ocurre una redistribución de los ligandos y sus receptores, los cuales pueden alcanzar diferentes organelos celulares dependiendo de sus características: el aparato de Golgi, el núcleo, la membrana plasmática o son degradados en los lisosomas.

El tráfico intracelular de las vesículas luego de la CME es controlado por las proteínas Rab, las cuales son pequeñas GTPasas, por lo que es un proceso dependiente de energía. Para la entrega de ADN utilizando esta vía de endocitosis se han acoplado proteínas (por ej.

transferrina) a los vectores de entrega (Kloeckner et al., 2004), sin embargo esto no garantiza el escape del ADN de la degradación lisosomal. Para lograr este objetivo se han utilizado diferentes estrategias como acoplar a los sistemas de entrega algún agente que perturbe la integridad de los endosomas. Por ejemplo, la polietilenimina (PEI) provoca el estallamiento de las vesículas endocíticas debido a un efecto conocido como “esponja de protones”. En el interior del endosoma los grupos amino de la PEI unen protones, lo cual retarda la acidificación del endosoma y provoca el influjo de iones Cl⁻ al lumen endosomal que desencadena un incremento de la presión osmótica y rompimiento del mismo, con la consecuente liberación del ácido nucleico al citoplasma (Sonawane et al., 2003). También se han utilizado péptidos fusogénicos que provocan la ruptura de la membrana endosomal o proteínas virales recombinantes con actividad endosomolítica (Curiel et al., 1991; Li et al., 2004).

1.2.2 Endocitosis dependiente de caveolina

Las caveolas son microdominios membranales hidrofóbicos ricos en colesterol y glicoesfingolípidos que se caracterizan por la presencia de caveolinas, una familia de proteínas de unión a colesterol (Harris et al., 2002). Estos dominios están presentes en muchos tipos celulares y son particularmente abundantes en células endoteliales (Conner y Schmid, 2003). La entrada a la célula del virus SV40 y de la toxina del cólera constituyen ejemplos típicos de la endocitosis dependiente de caveolina (Pelkmans et al., 2001; Vercauteren et al., 2010). Esta vía de entrada, a diferencia de la CME, es lenta, no degradativa, y los compuestos internalizados son direccionados al retículo endoplásmico liso. Las vesículas formadas tienen un diámetro que oscila entre los 50-60 nm, se denominan caveosomas por presentar caveolina, y no sufren una disminución del pH luego de separarse de la membrana plasmática. Los caveosomas pueden fusionarse entre sí para formar vesículas alargadas, las cuales posteriormente se segregan y forman estructuras tubulares que no contienen caveolina y que direccionan las moléculas endocitadas a la región perinuclear a través de los microtúbulos (Pelkmans et al., 2001). La entrada de moléculas mediante endocitosis a través de caveolas depende además de la presencia de colesterol e involucra al citoesqueleto de actina. Las drogas que secuestran colesterol (por ej. Metil- β -ciclodextrina) o que inhiben la polimerización de la actina (citocalasina D)

interfieren con la entrada dependiente de caveolina (Vercauteren et al., 2010). Por sus características, esta vía de endocitosis puede ser muy ventajosa para la entrega de ADN, por ejemplo, existen evidencias de que el ADN unido a polímeros catiónicos puede entrar a la célula a través de la endocitosis dependiente de caveolina y de clatrina, sin embargo sólo se expresa el gen transfectado cuando la entrada ocurre a través de caveolas (Rejman et al., 2005).

1.2.3 Macropinocitosis

La macropinocitosis ocurre cuando se extienden pseudópodos de la membrana plasmática de la célula que se forman por remodelación del citoesqueleto de actina. Como consecuencia se engloban y endocitan solutos del medio extracelular debido a un estímulo previo: presencia de factores de crecimiento o mitógenos que activan vías de señalización de proteínas cinasas (Swanson y Watts, 1995). Las vesículas formadas pierden la actina que las recubre y se convierten en macropinosomas, con un diámetro variable que puede alcanzar los 5 μm . El destino de las moléculas endocitadas por esta vía es diverso: en macrófagos los macropinosomas se fusionan a los lisosomas y los solutos son degradados (Meier y Greber, 2003); en cambio, en otros linajes celulares los macropinosomas permanecen sin fusionarse con otras vesículas endocíticas aunque experimentan una disminución del pH, y reciclan gran parte de su contenido al exterior celular. Estas vesículas pueden expulsar parte de su contenido al citosol, por lo que la macropinocitosis constituye un medio de entrada apropiado para la entrega de material genético. Existen reportes que sugieren que la macropinocitosis es el mecanismo de entrada a la célula de péptidos ricos en arginina, los cuales se unen al heparán sulfato presente en la membrana plasmática de las células (Kaplan et al., 2005). El uso de liposomas modificados con péptidos ricos en arginina como acarreadores de ADN produjo altos niveles de transfección en células NIH3T3. En este caso, los altos niveles de transfección correlacionaron con la entrada de los complejos liposoma-ADN mediante macropinocitosis, lo cual se demostró con el uso de inhibidores de esta vía endocítica como la amilorida, que inhibe los intercambiadores Na^+/H^+ (Khalil et al., 2006).

1.2.4 Fagocitosis

La fagocitosis ocurre en los mamíferos en células especializadas (fagocitos) como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Para que se active el proceso de fagocitosis debe existir primeramente una unión específica entre una partícula y receptores localizados en la membrana de los fagocitos, por ej. receptores Fc o de complemento, lo cual activa cascadas de señalización que provocan una reorganización local del citoesqueleto de actina. Esta reorganización del citoesqueleto produce la extensión de pseudópodos en la membrana plasmática de la célula, los cuales rodean a la partícula que será fagocitada y la internalizan (Allen y Aderem, 1996). Las partículas fagocitadas tienen generalmente un diámetro mayor a 500 nm, aunque en ensayos donde se evaluó el nivel de internalización de partículas de diferente diámetro en macrófagos alveolares de ratón se observó que las partículas cuyos diámetros oscilaban entre los 2 y 3 μm fueron preferentemente fagocitadas, comparado con otras de menor o mayor tamaño (Champion et al., 2008). Luego de su internalización, la actina se libera de los fagosomas, los cuales sufren un proceso de maduración en el que ocurren eventos de fusión con endosomas y lisosomas para formar los fagolisosomas (Fairn y Grinstein, 2012). Puesto que el proceso de fagocitosis es degradativo, es difícil suponer que constituye un mecanismo de entrada adecuado para los sistemas de entrega de material genético, sin embargo existen evidencias de que algunos complejos liposomas catiónicos-ADN y polímeros catiónicos-ADN pueden ser internalizados por esta vía (Matsui et al., 1997; Kopatz et al., 2004). Recientemente se reportó la transfección de macrófagos y células dendríticas de ratón *in vivo* utilizando un complejo ADN-liposoma modificado con colesterol-manosilado. Estas moléculas se unieron específicamente a células presentadoras de antígeno a través de sus receptores de manosa y se expresó con éxito el gen reportero. En este estudio los complejos ADN-liposomas fueron administrados por vía intraperitoneal y la expresión del gen reportero se detectó en macrófagos tanto en la cavidad peritoneal como en el hígado, bazo y linfonodos y en células dendríticas del bazo (Hattori et al., 2006).

1.2.5 Inhibidores de endocitosis

Una de las estrategias más utilizadas para dilucidar cuál es el mecanismo de entrada de los sistemas de entrega de material genético a las células blanco es el uso de inhibidores de

endocitosis, los cuales poseen diferentes niveles de especificidad para las rutas endocíticas mencionadas previamente (Vercauteren et al., 2010). Los tratamientos que interfieren con el ensamblaje de la cubierta de clatrina como la reducción del potasio intracelular y la adición de clorpromazina se clasifican como inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina (Larkin et al., 1983; Itoh et al., 2008), no obstante no son exclusivos de esta vía ya que se ha sugerido que la reducción de potasio también interfiere con la fagocitosis (Matsui et al., 1997). Las sustancias como la metil- β -ciclodextrina y la nistatina (que secuestran el colesterol de la membrana plasmática) y la filipina (que se une al colesterol) se clasifican como inhibidores de la endocitosis dependiente de caveolina, debido a que las caveolas son dominios membranales ricos en colesterol. Sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos interfieren con otras vías endocíticas donde la presencia de colesterol influye en el reconocimiento de ciertos receptores asociados a las balsas lipídicas. Podemos citar como ejemplo la inhibición de la entrada de la transferrina a diferentes líneas celulares como HEP-2, NIH/3T3, MDCKII, COS-1 y A431 luego de la adición de 10 mM de M β CD al cultivo (Rodal et al., 1999), por lo que este compuesto también se asocia a la inhibición de la endocitosis dependiente de clatrina. La nistatina también ha estado asociada a la inhibición de la macropinocitosis y la endocitosis dependiente de clatrina (Wadia et al., 2004; Florian et al., 2012). La genisteína es un inhibidor de las tirosin-quinasas, por lo que actúa sobre varios mecanismos endocíticos. Se ha reportado que inhibe la fosforilación de Caveolina-1 por la cinasa c-Src por lo que inhibe la internalización de compuestos dependiente de la formación de caveosomas (Pelkmans et al., 2005). La adición de genisteína además inhibe la fagocitosis dependiente de receptores Fc γ y de complemento así como la fagocitosis a través de los receptores scavenger en macrófagos (Strzelecka-Kiliszek et al., 2004; Swanson y Hoppe, 2004; Sulahian et al., 2008). Las citocalasinas inhiben la polimerización del citoesqueleto de actina, por lo que se conocen como inhibidores de la macropinocitosis y la fagocitosis, procesos donde el citoesqueleto juega un papel fundamental en la formación de pseudópodos en la membrana plasmática (Parton et al., 1994). Los inhibidores del intercambiador Na⁺/H⁺ como la amilorida y de la fosfatidil inositol-3 cinasa como la wortmanina inhiben la macropinocitosis (Arcaro y Wymann, 1993; Hewlett et al., 1994; Kjekken et al., 2001).

1.3. Los rotavirus

La infección por rotavirus constituye la primera causa de diarrea severa en niños, provocando la muerte de aproximadamente 450 000 infantes por año (Glass et al., 2013). Cada año los rotavirus causan 114 millones de episodios de gastroenteritis que requieren cuidado en casa, 25 millones de visitas al doctor y 2 millones de hospitalizaciones en niños menores de 5 años (OMS, 2007). Los rotavirus infectan las células de la mucosa intestinal provocando diarrea, fiebre y vómito como síntomas principales, lo que conlleva a una deshidratación severa en los niños más afectados.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. Son virus no envueltos de simetría icosaédrica que presentan un genoma compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena. Este genoma codifica para las 12 proteínas virales: seis estructurales, incluidas en la partícula viral y denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y seis proteínas no estructurales denominadas NSP1 al 6. La partícula viral completa tiene un diámetro aproximado de 75 nm, y tiene forma de rueda, de ahí su nombre, el cual proviene del Latín *rota*. Los rotavirus están compuestos por tres capas proteicas concéntricas. La nucleocápside viral está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual engloba a las proteínas VP1, VP3 y a los 11 segmentos de ARN viral (Fig.3). La capa intermedia del virión está formada por 260 trímeros de la proteína VP6, la cual constituye el 51% del contenido proteico total del rotavirus (Estes, 1997). La capa más externa del virión la constituyen 780 moléculas de la proteína VP7, la cual presenta entre uno y tres sitios potenciales de glicosilación, dependiendo de su genotipo. Sobresaliendo de la capa externa se encuentran 60 espículas formadas por trímeros de la proteína VP4 sensible a proteasas, mayormente a la tripsina pancreática. El corte proteolítico que sufre VP4 es imprescindible para que comience el proceso infeccioso del rotavirus. La partícula viral presenta además 132 canales que la atraviesan desde la capa más interna a la externa, y se plantea que estos orificios son utilizados para la entrada de metabolitos necesarios para la síntesis del ARN mensajero, así como para la salida del mismo hacia el citoplasma de la célula infectada (Lawton et al., 1997). Durante su entrada al enterocito, los rotavirus pierden la capa más externa formada por VP7 y VP4, convirtiéndose en partículas virales de doble capa transcripcionalmente activas. Es de destacar que la presencia de VP6 es necesaria para que

Introducción

ocurra la transcripción del genoma de los rotavirus, aunque aún no se conoce la función de esta proteína en el proceso.

Durante la infección, los rotavirus producen ARNm para la síntesis proteica y la replicación de su genoma. La mayoría de las proteínas de rotavirus sintetizadas se acumulan en viroplasmos, los cuales constituyen fábricas de ensamblaje de partículas virales de doble capa. Los viroplasmos se visualizan desde las dos horas posteriores a la infección viral localizados alrededor del núcleo de la célula infectada. Las partículas de doble capa ensambladas en los viroplasmos adquieren las proteínas VP7 y VP4 en el retículo endoplasmático y los viriones completos son liberados al medio mediante lisis de la célula hospedera (Jayaram et al., 2004; Patton et al., 2004).

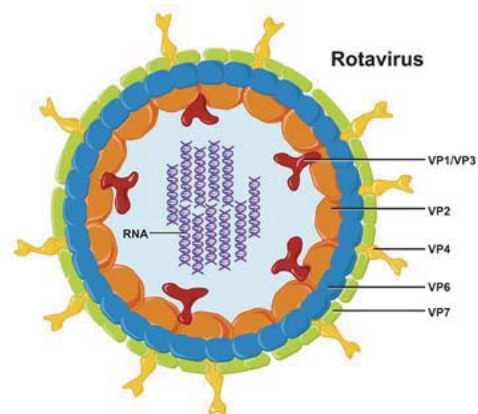


Fig. 3. Estructura del rotavirus (Dennehy, 2008)

1.3.1 La proteína VP6 de rotavirus

Entre los años 1974 y 1979 varios autores observaron la presencia de estructuras tubulares en las heces de individuos infectados con rotavirus, los cuales fueron llamados rotatubos. Estas estructuras se aglutinaban *in vitro* utilizando sueros específicos contra rotavirus, por lo cual se concluyó que estaban formadas por alguna proteína rotaviral. Más tarde se identificó que esos tubos estaban compuestos por la proteína de cápside de rotavirus VP6 (Flewett et al., 1974; Kimura y Murakami, 1977; Chasey y Labram, 1983). El estudio de la inmunogenicidad de las proteínas que conforman la cápside de los rotavirus señalan a VP6 como la proteína más inmunogénica, a pesar de que no induce una respuesta de anticuerpos

neutralizantes debido a su localización en la capa intermedia de la cápside viral. En estos estudios se utilizaron como inmunógenos tanto partículas virales de doble capa (a las cuales se les ha eliminado VP4 y VP7) o proteína VP6 expresada de forma recombinante (Schwartz-Cornil et al., 2002; McNeal et al., 2002; Corthesy et al., 2006; Ward y McNeal, 2010). El mecanismo de expulsión de los virus que se encuentran en el interior de los enterocitos se ha postulado con base en el uso de anticuerpos IgA anti-VP6. Se plantea que durante su transcitosis desde la membrana basolateral hacia el lumen del tracto gastrointestinal, las IgAs poliméricas se unen a la proteína VP6 y ésta es expulsada al lumen del intestino. Otros experimentos sugieren que las IgAs durante su paso por el enterocito inhiben la replicación (Corthesy et al., 2006) o la transcripción viral (Burns et al., 1996; Feng et al., 2002).

La proteína VP6 está formada por dos dominios: un dominio de hojas β -plegadas (dominio H), el cual está en contacto con la proteína viral VP7, y un dominio B, constituido mayormente por α -hélices, el cual hace contacto con la proteína VP2 en su zona más distal (Figura 4A). Se ha planteado que las interacciones hidrofóbicas son muy importantes para la unión de VP6 con VP2 en la partícula viral, aunque también pueden participar interacciones electrostáticas (Mathieu et al., 2001; Charpilienne et al., 2002). Los aminoácidos que forman parte del loop más distal del dominio B de VP6 (loop β b- α c), que comprende a los aminoácidos desde el 60 al 74, son los que establecen el mayor número de interacciones con la proteína de rotavirus VP2 (Charpilienne et al., 2002). Además, este loop constituye la región más conservada dentro de la cadena polipeptídica de VP6, principalmente los aminoácidos que van de la posición 65 a la 71 (Figura 4B). Estos autores han postulado que la proteína VP6 puede interactuar con los nucleósidos trifosfato, tal como lo hace la proteína VP7 del virus de la fiebre aftosa, la cual posee una estructura atómica y localización en la partícula viral similar a VP6 (Diprose et al., 2001), y de esta forma llevar a cabo la adecuada transcripción del ARN viral. La expresión simultánea de las proteínas de cápside de rotavirus VP2 y VP6 utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus, resulta en el ensamblaje de las mismas en partículas virales de doble capa (Mena et al, 2006). Sin embargo, cuando solamente se expresa VP6, ésta se ensambla

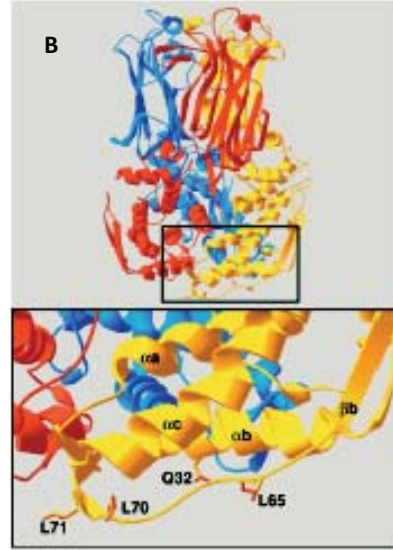
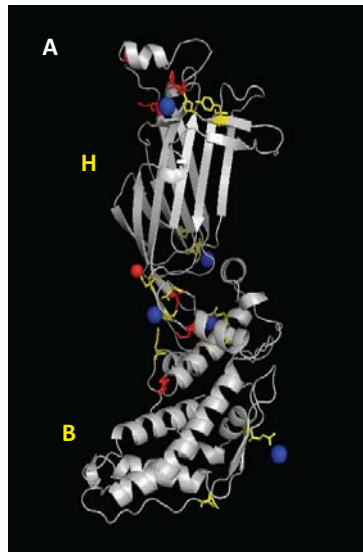
Introducción

formando nanotubos o icosaedros de diferente diámetro, en dependencia de las condiciones de pH y fuerza iónica del medio (Figura 5) (Lepault, et al., 2001). En ausencia de cationes divalentes, el pH del medio es el principal parámetro que controla el estado de agregación de VP6. En general, cuando el pH del medio oscila entre 5.5 y 7, la proteína VP6 se ensambla casi en su totalidad en forma de tubos que tienen un diámetro aproximado de 75 nm (tubos anchos) y que pueden tener varios micrómetros de longitud. Si el pH del medio se encuentra entre 3.5 y 5.5, casi toda la VP6 se encuentra formando icosaedros de diámetro variable, predominando los de 75 nm. Por encima de pH 7, se observan tubos de un diámetro aproximado de 45 nm (tubos estrechos), los cuales también tienen varios micrómetros de largo. Los icosaedros formados por VP6 tienen un diámetro mayor que las partículas de doble capa VP2/6, lo que subraya la importancia de la proteína VP2 en el empaquetamiento adecuado de las cápsides virales.

En nuestro grupo se ha logrado inducir el proceso de desensamblaje *in vitro* de los tubos de VP6 mediante la adición de 200 mM del catión Ca^{2+} a la solución de proteína. La reacción de desensamblaje tiene un comportamiento de decaimiento exponencial en dos etapas, en las cuales, los tubos de VP6 se desensamblan primeramente a trímeros, que constituyen intermediarios de la reacción, y luego los trímeros pasan a formar monómeros (Mena, 2007). La proteína VP6 desensamblada ha vuelto a ensamblarse en tubos mediante la adición de un agente quelante como el EGTA y la adición del catión Zn^{2+} al medio (Mena, 2007). La proteína VP6 forma trímeros que tienen forma de torre, con una longitud de 95 Å. Ambos dominios B y H participan en las interacciones que mantienen la estabilidad de los trímeros de VP6, pero mediante determinadas mutaciones realizadas en estos dominios, se ha mostrado que el dominio H es el más comprometido en la formación de los trímeros de VP6 (Affranchino y González, 1997). Mediante criomicroscopía electrónica, se ha sugerido que la unidad repetitiva que forma los tubos y/o esferas es un dímero de trímeros de VP6, y que el contacto particular entre ambos dímeros está determinado por su estado de protonación. Se plantea además que la superficie lateral de los trímeros de VP6, implicada en los contactos inter-trímero, está cargada negativamente (Mathieu et al., 2001). La estructura de rayos X de VP6 muestra la presencia de 5 sitios de unión a Ca^{2+} , tres de los cuales se encuentran en la zona de contacto inter-trímero para la formación de los tubos y/o

Introducción

esferas y los otros dos están en la zona de trimerización, por lo que no están expuestos al solvente (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001). Además, los trímeros presentan en su interior un sitio de coordinación a Zn^{2+} , cuya presencia contribuye a la estabilidad de los mismos (Erk et al., 2003). Uno de los mecanismos propuestos para el desensamblaje de los tubos de VP6 es una primera etapa de desestabilización de los mismos por la entrada de Ca^{2+} a los tres sitios accesibles por el solvente y luego del desensamblaje de las macroestructuras, los otros dos sitios intra trímeros se hacen más accesibles al Ca^{2+} en una segunda etapa y de esta forma se obtienen monómeros de VP6 (Mena, 2007). En nuestro laboratorio se ha establecido un proceso de obtención y purificación de nanotubos de VP6 utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus que permite la obtención de la proteína con un porcentaje de pureza superior al 98% (Plascencia-Villa et al., 2011). El contar con proteína VP6 de alto grado de pureza ha permitido profundizar en las propiedades de los nanotubos tales como su capacidad de unión a metales. Plascencia-Villa et al. (2009) funcionalizaron la superficie externa de los nanotubos de VP6 con metales tales como oro, plata y paladio, confiriéndoles a los mismos propiedades magnéticas y catalíticas. De forma similar, Carreño-Fuentes et al. (2013) funcionalizó la superficie interna de los nanotubos de VP6 con plata permitiendo la formación de nanoalambres. Hasta que comenzamos con este proyecto, no existía ningún reporte sobre la capacidad de los nanotubos de VP6 de interactuar con biomoléculas o con células.



- **Ca²⁺**
Amino acids in contact with Ca
-Tyr 248
-Asn 250, 266
-Asp 337, 62, 286, 380
-Glu 134, 379, 340
-Gln 47, 268, 383

- **Zn²⁺** (His153)

Mathieu et al., 2001

Fig.4. A. Modelo del monómero de VP6 obtenido por difracción de rayos X. En amarillo se muestran los dominios H y B de VP6. **B.** Modelo del trímero de VP6 donde cada monómero se muestra de un color diferente.

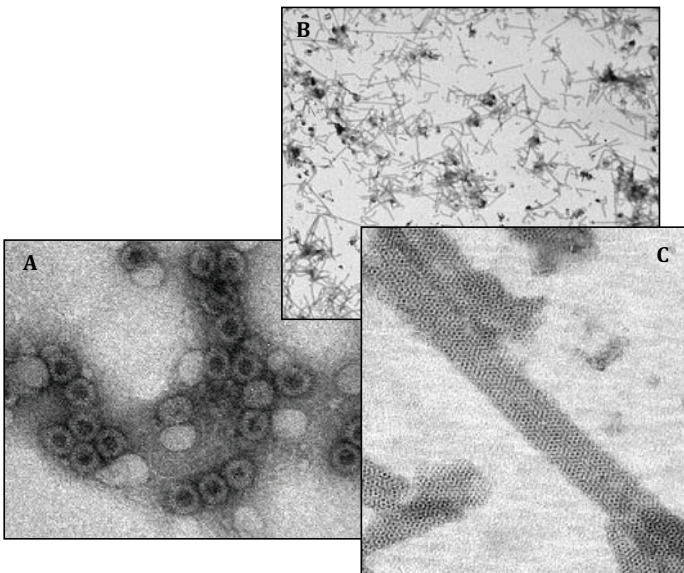


Fig.5. Partículas de doble capa VP2/VP6 y tubos de VP6 obtenidos en nuestro laboratorio. Las muestras proteicas fueron teñidas con acetato de uranilo y se visualizaron mediante microscopía electrónica. A: PPVs 2/6 (foto tomada por Jimmy Mena, 2006). B: Tubos de VP6 10 000X. C: tubos de VP6 100 000X.

2. Justificación

El desarrollo de sistemas de entrega de material genético que no involucre el uso de virus ha tomado fuerza en los últimos años a partir de los resultados obtenidos en ensayos clínicos donde se documentó la aparición de reacciones adversas graves e incluso la muerte de pacientes tratados con vectores virales, principalmente con γ -retrovirus (Galy y Thrasher, 2011; Aiuti et al., 2012; Corrigan-Curay et al., 2012; Nienhuis, 2014). Debido a esto, varios grupos de investigación trabajan en el diseño de sistemas de entrega de ADN que no involucre el uso de virus vivos. Los materiales utilizados para la entrega de material genético son generalmente menos tóxicos e inmunogénicos que los virus, y pueden además ser modificados químicamente para conferirles especificidad hacia ciertos tipos celulares o tejidos (Al Dosari y Gao, 2009).

Entre los posibles candidatos se encuentran las partículas pseudovirales, formadas por proteínas virales expresadas de manera recombinante, que presentan la ventaja de carecer de material genético, por lo que son incapaces de replicarse en el hospedero. La proteína VP6 de rotavirus expresada de forma recombinante y ensamblada en forma de esferas ha sido utilizada con éxito como acarreador del fármaco doxorubicina a células de hepatoma Hep-G2 (Zhao et al., 2011), sin embargo no existen estudios que involucren el uso de VP6 en forma de nanotubos como acarreadores de biomoléculas. Teniendo en cuenta los reportes que muestran la ventaja de las estructuras tubulares como acarreadores de fármacos debido a su mayor volumen interno, resulta interesante evaluar la capacidad de los nanotubos de VP6 como acarreadores de fármacos.

Charpillienne et al. (2002) postularon que VP6 puede tener en el rotavirus el mismo papel que tiene la proteína VP7 del virus de la fiebre aftosa (BTV) en el proceso de transcripción viral, el cual es unir a los nucleosidos trifosfato mediante interacciones electrostáticas a través de la región inter-trímero y permitir la salida del ARN mensajero sintetizado a través de la cápside de las DLPs. El análisis del estado de protonación de VP6 a pH8 mostró la presencia de cargas positivas en la región distal de los trímeros, las cuales se orientan hacia la luz de los nanotubos de VP6 (Plascencia-Villa et al., 2009). Estas regiones con carga positiva podrían estar implicadas en la interacción de VP6 con ácidos nucleicos.

Introducción

En el año 2007, Gualtero y colaboradores determinaron que la proteína VP6 interviene en la entrada de los rotavirus a las líneas celulares CaCo-2 y MA104, las cuales se utilizan con frecuencia para la replicación *in vitro* del virus. Mediante ensayos de ELISA sugirieron que la proteína Hsc70 presente en la membrana de estas células puede ser el ligando de VP6 que facilita la inserción del rotavirus a la membrana celular. Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de explorar nuevas capacidades de los nanotubos de VP6 nos propusimos en el presente trabajo estudiar sus propiedades como agentes acarreadores de ácidos nucleicos al interior de células de mamífero.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Los nanotubos de VP6 tienen la capacidad de encapsular ADN plasmídico en su interior y entregarlo a células de mamífero cultivadas in vitro.

3.2 Objetivo general

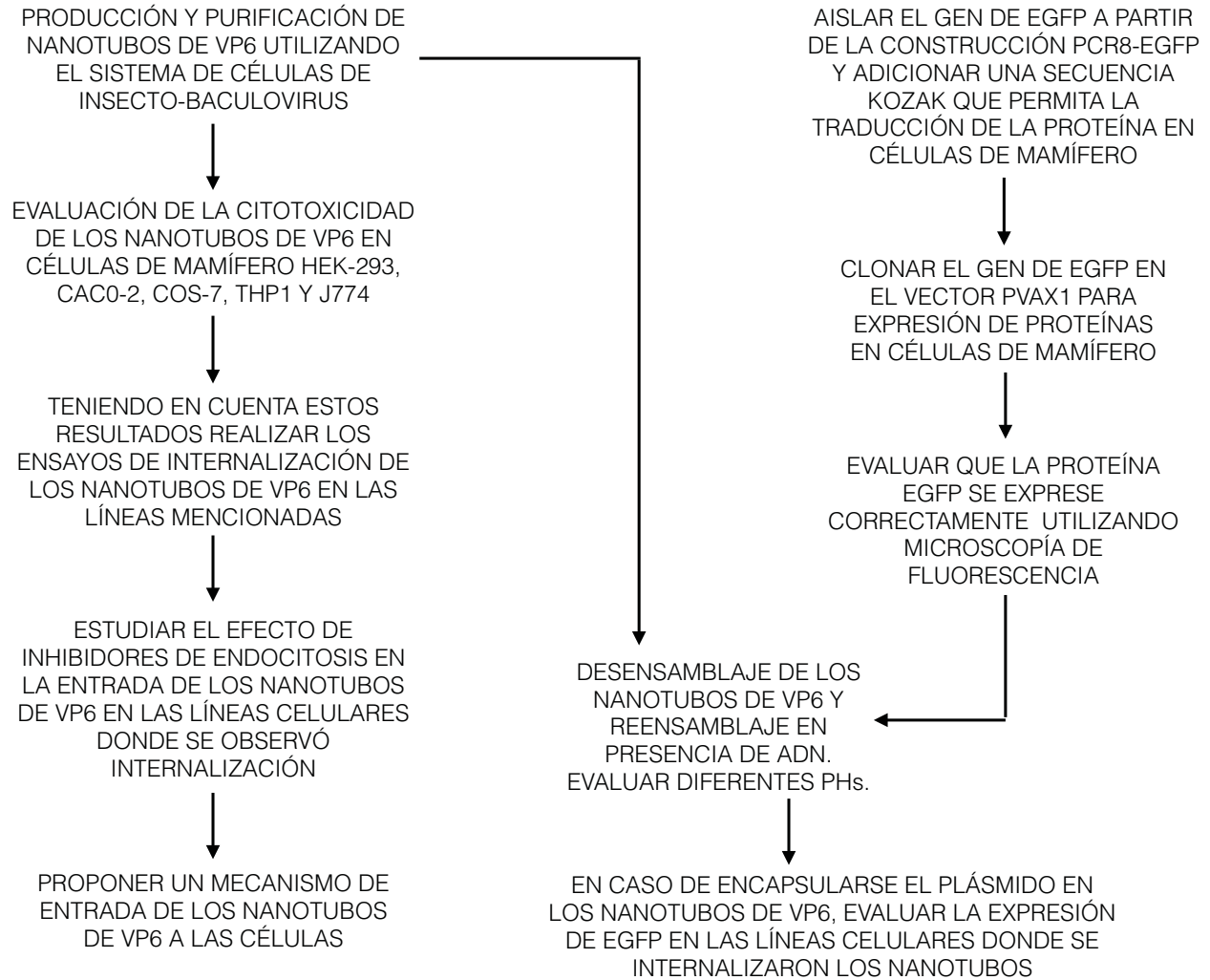
Explorar la capacidad de los nanotubos de VP6 de ser internalizados por diferentes líneas celulares de mamífero y establecer un método para encapsular ADN en el interior de los nanotubos de VP6.

3.3 Objetivos específicos

1. Evaluar la citotoxicidad de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero para determinar si pueden ser utilizados como sistema de entrega sin afectar al hospedero.
2. Determinar en qué líneas celulares de mamífero se internalizan los nanotubos de VP6.
3. Estudiar el proceso de encapsulación de plásmidos en tubos de VP6 mediante la manipulación del pH y el método de desensamblaje y reensamblaje *in vitro* de éstos.
4. Determinar si este sistema de encapsulación permite la entrega de material genético al interior de las células de mamífero mediante la expresión de la proteína GFP.

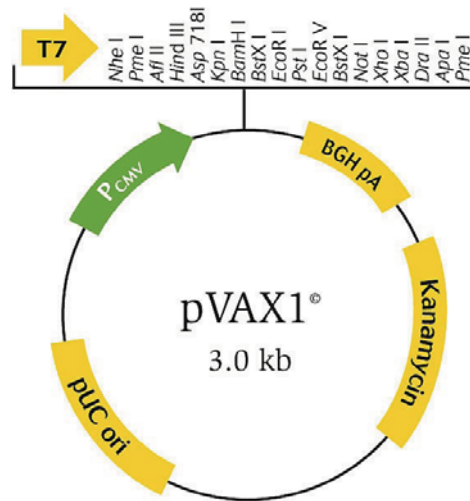
4. Materiales y Métodos

A continuación se muestra un diagrama experimental del trabajo:



4.1 Clonación del gen de EGFP en el vector pVAX1

En este trabajo se utilizó el plásmido pVAX1 (Invitrogen, V260-20) el cual permite la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero bajo el promotor de citomegalovirus. En dicho plásmido se clonó el gen que codifica para la proteína EGFP (Rojas, 2009) (reportero de expresión para los ensayos de internalización *in vitro*). A continuación se muestra el mapa del plásmido pVAX1:



(Mapa tomado de *Invitrogen*: www.lifetechnologies.com)

4.1.1 Obtención del gen de la EGFP

Para subclonar la proteína EGFP en el vector pVAX1 partimos de un plásmido obtenido en nuestro laboratorio por el MC. R. Rojas en el que el gen codificante para la proteína EGFP se clonó en el vector pCR8TOPO (Invitrogen, K252020) . Este gen carecía del codón de terminación de la transcripción y de secuencias Kozak, por lo que mediante un ensayo de PCR con oligonucleótidos diseñados por nosotros (Tabla 1), amplificamos el gen que codifica para la EGFP y le adicionamos el codón de terminación de la transcripción así como una secuencia Kozak al inicio del gen, lo cual permite aumentar la eficiencia del proceso de traducción. En la Figura 6 se muestra la construcción de partida pCR8TOPO-EGFP.

Oligonucleótido	secuencia
Forward	5'-aaggagggatAccatggtgag-3'
Reverse	5'-ggatccccgctTtacttgta-3'

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. La secuencia se representa en la dirección 5'-3'. En mayúscula se muestran las bases que cambiamos respecto a la secuencia de R. Rojas.



Fig.6. Construcción pCR8TOPO-EGFP (4675 pb). En rojo se muestra la secuencia del vector pCR8TOPO y en negro se muestra la secuencia del gen de la EGFP. Las flechas indican el sitio de hibridación de los oligonucleótidos Forward y Reverse.

Una vez amplificado el gen de la EGFP, éste se purificó a partir de una electroforesis en gel de agarosa y se clonó en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen, K4500-02) (Figura 7), el cual utiliza las propiedades de la enzima topoisomerasa I para una clonación eficiente de los productos de PCR. El resultado de esta clonación se transformó en células de *E. coli* de la cepa One-Shot TOP10 (Invitrogen, K4500-02). Como resultado de la transformación se obtuvieron numerosas colonias, las cuales se sembraron en medio de cultivo LB líquido para la purificación del ADN plasmídico utilizando el *Miniprep Purification Kit* (Qiagen, 27106). La inserción correcta del gen que codifica para la EGFP en el vector pCR2.1TOPO

se analizó mediante una digestión con las siguientes enzimas de restricción de BioLabs: *Hind* III (R0104T), *EcoR* I (R0101S), *BamH* I (R0136T) y *Nco* I (R0193T). Una de las colonias que mostró el patrón de restricción esperado fue utilizada para la subclonación del gen de la EGFP en el vector pVAX1.

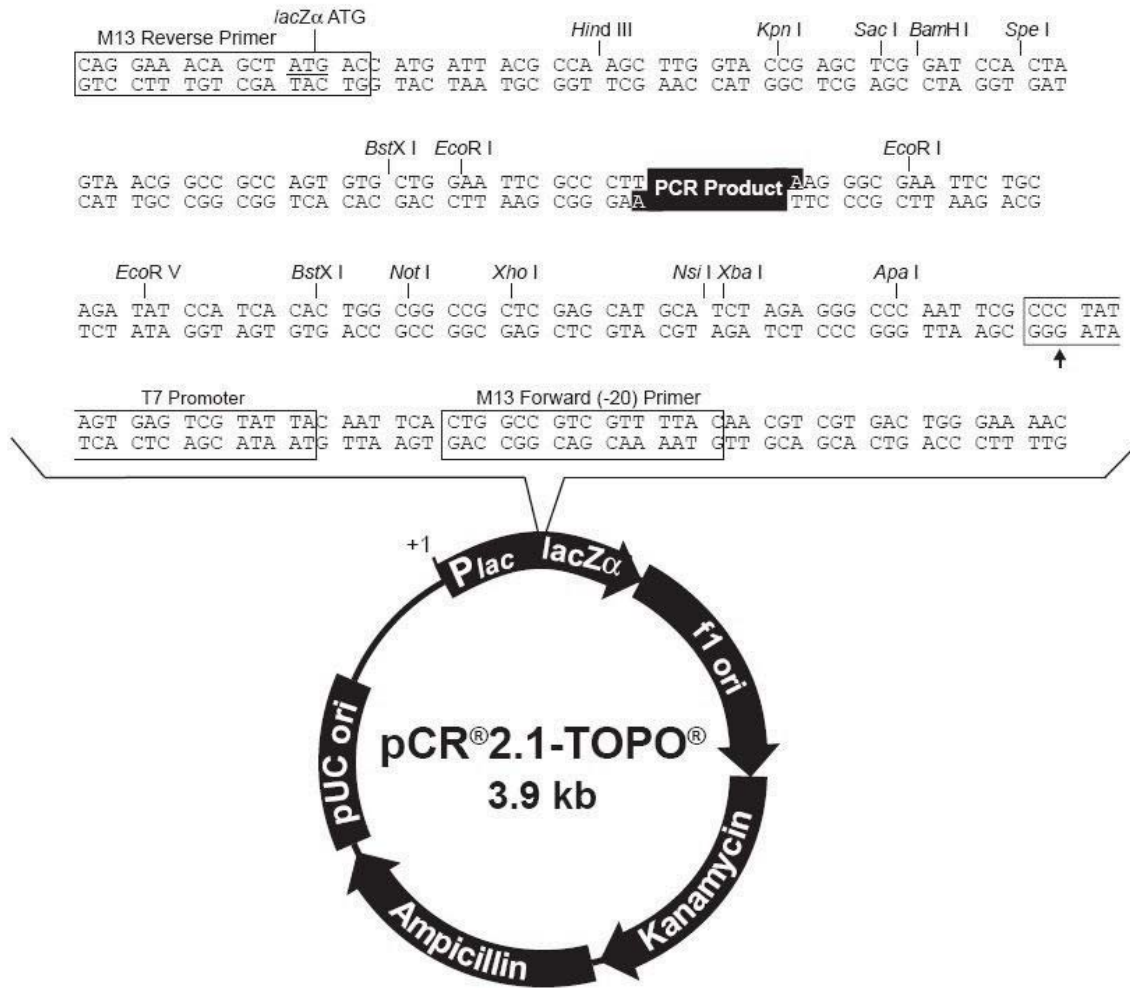


Fig.7. Mapa del vector pCR2.1 TOPO. Se muestra el mapa del vector y la secuencia del sitio de múltiple clonaje (Tomado de *Invitrogen*).

4.1.2 Subclonación del gen de EGFP en el vector pVAX1

Los vectores pCR2.1TOPO-EGFP y pVAX1 fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR* I. Los productos de la digestión fueron separados mediante una electroforesis en gel

de agarosa y las bandas de interés se aislaron y purificaron del gel utilizando el *PCR Product Purification Kit* (Roche, 11 732 676 001). Los fragmentos se ligaron utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (Biolabs, M0202S) durante 20 horas a 16 °C y el producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* de la cepa One Shot TOP10. El análisis de las colonias obtenidas se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR, en el cual utilizamos los oligonucleótidos T7 Forward (Invitrogen, N560-02) y Reverse (cuya secuencia se mostró previamente). T7 Forward hibrida en el extremo 5' del sitio de múltiple clonaje del vector pVAX1, y Reverse hibrida en el extremo 3' del gen de la EGFP, por tanto sólo se observarán productos de PCR en aquellas colonias que tengan insertado el gen de la EGFP en el vector pVAX1 en la orientación adecuada. Una vez detectadas las colonias donde se observaron bandas correspondientes al gen de la EGFP, se sembraron en medio de cultivo LB para la purificación de ADN plasmídico, el cual se analizó realizando una digestión con las enzimas de restricción *BamH I* y *EcoR I*. Las colonias que mostraron el patrón de restricción esperado fueron secuenciadas y el resultado se analizó utilizando el programa Gene Inspector (Texco, Inc).

4.2 Producción y purificación de los nanotubos de VP6

Utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus para la expresión de proteínas recombinantes, en nuestro laboratorio se desarrolló una metodología para la obtención de nanotubos de VP6 con un alto grado de pureza (Plascencia-Villa et al., 2011). Brevemente, células de insecto HighFive® cultivadas en medio Express Five® (Gibco, Invitrogen, 10486) a una densidad celular de 0.5×10^6 células/mL se infectaron con un baculovirus recombinante que codifica para la proteína de cápside de rotavirus VP6 de la cepa SA11 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 unidades formadoras de placa (ufp)/mL. Este baculovirus fue donado por la Dra. S. López del IBT-UNAM. Luego de 96 h el sobrenadante de cultivo se separó por centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos y se concentró utilizando un sistema de ultrafiltración AMICON (Millipore, 5124) usando una membrana de celulosa regenerada con corte de 30 ó 100 KDa (Millipore, PLTK 07610, 14442AM). Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina Q-Sepharosa *Fast Flow* (GE Healthcare, 17-0510-01) en la que la proteína VP6

eluye en la fracción que no interactúa con la resina luego de inyectar el sobrenadante concentrado. La solución tampón utilizada fue de Tris-HCl 30 mM, pH 6.16. La elución de las proteínas adheridas a la resina se realizó con la misma solución tampón a la que se le adicionó 1 M NaCl. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema ÄktaPrime plus (GE Healthcare, 11-0013-13) con el cual se controló el flujo a 2.0 mL/min y se monitoreó la absorbancia a 280 nm, la conductividad y el pH. Seguidamente, realizamos una cromatografía de exclusión en gel utilizando la resina Toyopearl HW65F (Tosoh, 07465) en la que se inyectó la fracción obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico que no interactúa con la resina. Los nanotubos formados por la proteína VP6 eluyen en el volumen vacío de la columna. Para este paso cromatográfico se utilizó una solución tampón de Tris-HCl 30 mM pH 8. La presencia de VP6 en todos los pasos cromatográficos se detectó mediante ensayos de SDS-PAGE y Western Blot. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de Bradford, usando el reactivo del mismo nombre (Bio-Rad, 500-0006). Los nanotubos purificados se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) en un JEM-1011 (Jeol, Japón) o un EM900 (Zeiss, Alemania), ambos operados a 80 kV. Para ello, las muestras purificadas se adhirieron a una rejilla de cobre-carbón-formvar (F-200-Cu, Electron Microscopy Sciences) y se tiñeron con una solución de acetato de uranilo 1-2%. La purificación de las partículas de doble capa GFP-VP2/VP6 se realizó utilizando el mismo protocolo, con la diferencia de que las células de insecto HighFive® se infectaron además con un baculovirus recombinante que codifica para la proteína de cápside de rotavirus VP2 fusionada a GFP. Este baculovirus fue donado por el Dr. Jean Cohen (Charpilienne et al., 2001).

4.3 Cultivo celular

Las líneas celulares de mamífero HEK-293, COS-7 y CaCo-2 fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma, D5030), suplementado con 4500 mg/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio, 25 mM Hepes, 4 mM L-glutamina, 3.7 g/L bicarbonato de sodio, MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×) (Sigma, M7145) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen, 12483-020). La línea de monocitos humanos THP1 y la línea de macrófagos murinos J774 se cultivaron en Advanced RPMI reduced serum medium (Gibco,

Invitrogen, 12633-12) suplementado con 5% (v/v) SFB, 2 mM de glutamina (Sigma, G3202) y 0.05 mM β -mercaptoetanol (Aldrich, M6250). Las células CaCo-2 se derivan de carcinoma de colon, las células HEK-293 se obtuvieron del riñón de un embrión humano, la línea COS-7 proviene del riñón del mono verde africano, las células J774 se establecieron a partir de un sarcoma extraído de ratones BALB/c y las células THP1 provienen de la sangre periférica de un niño de 1 año que presentaba leucemia (<http://www.atcc.org>). Para la diferenciación de las células THP1 de monocitos a macrófagos, se adicionaron 50 ng/mL de Forbol 12-miristato 14-acetato (PMA) (Calbiochem, Merck, 524400) al medio de cultivo 96 h previas a la realización de los ensayos de citotoxicidad e internalización de los nanotubos de VP6. En el caso de las células J774, se adicionó la misma cantidad de PMA durante 48 h para incrementar su capacidad fagocítica. Todas las células se incubaron a 37 °C y en atmósfera de 5% CO₂. La viabilidad y concentración celular se determinó mediante un hemocitómetro y tinción con azul de tripano (Housser scientific, 3110).

4.4 Producción del AcM 255/60

Para realizar los ensayos de inmunodetección de los nanotubos de VP6 adicionados a las líneas celulares de mamífero necesitábamos AcM específicos contra esta proteína, por lo que nos dimos a la tarea de producir líquido ascítico en ratones con este fin. Primeramente, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 100 μ L de pristane (Sigma, P2870) y 15 días más tarde, fueron inoculados también por vía intraperitoneal con 1×10^6 células del hibridoma productor de un AcM específico contra VP6 denominado 255/60, donado por el grupo de la Dra S. López (IBT, UNAM). Al cabo de los 15 días se colectó el líquido ascítico formado en los animales y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante recolectado se pasó por una columna de Sefarosa 4B acoplada a Proteína G (Life technologies, 10-1243) previamente equilibrada con una solución tampón de Tris-HCl 50 mM, 0.5 M NaCl pH 8. El AcM 255/60 se eluyó con una solución de HAc 100 mM y se colectó en tubos Eppendorf que contenían una solución de 2 M Tris-HCl pH 8 para prevenir la desnaturalización de la proteína. La especificidad del AcM producido se analizó mediante ensayos de SDS-PAGE y Western Blot.

4.5 Ensayos de citotoxicidad de los nanotubos de VP6

Las líneas celulares HEK-293, COS-7 y CaCo-2 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 10^4 células en 100 μ L de medio de cultivo DMEM 10% SFB. 24 h más tarde se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 50 μ L de diferentes diluciones de los nanotubos de VP6 previamente diafiltrados en medio de cultivo sin suero. Las líneas celulares THP1 y J774 se sembraron a una concentración de $2 \cdot 10^4$ células en 100 μ L de medio de cultivo RPMI 5% SFB y luego de su diferenciación con PMA a los tiempos indicados previamente se adicionaron diferentes concentraciones de los nanotubos de VP6. Luego de 2 h de incubación se adicionaron 10 μ L de una solución de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio, Sigma-Aldrich, M2128) a 5 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO, D8779). El MTT al ser hidrolizado por las enzimas mitocondriales genera una sal de formazán de color morado cuya intensidad es proporcional al número de células vivas. Dos horas más tarde las placas se centrifugaron a 2000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Los cristales de formazan se disolvieron con 50 μ L de DMSO y se midió la absorbancia en un lector de placas (ELx800, Bio-Tek Instruments Inc.) a una longitud de onda de 595 nm. La viabilidad celular relativa se calculó considerando 100 % a la señal obtenida de las células incubadas solamente con medio de cultivo.

4.6 Ensayos de citotoxicidad de los inhibidores de la endocitosis Metil- β -ciclodextrina y Genisteína en células THP1 y J774

Se sembraron células THP1 y J774 en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de $2 \cdot 10^4$ células por pozo y se diferenciaron a macrófagos en presencia de PMA (50 ng/mL) durante 96 h y 48 h respectivamente. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se adicionaron diferentes concentraciones de los inhibidores de endocitosis M- β -ciclodextrina (Sigma, C4555) y Genisteína (Sigma, G6649) diluidos en medio RPMI sin SFB. Las células se incubaron durante 2 h y luego se adicionaron 10 μ L de una solución stock de MTT (5 mg/mL) y las células se incubaron por 2 h más. Seguidamente las placas se centrifugaron a 2000 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las sales de formazán formadas como producto de la hidrólisis del MTT se disolvieron con 50 μ L de

DMSO. Se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (ELx800, Bio-Tek Instruments Inc.).

4.7 Internalización de los nanotubos de VP6 en células de mamífero

Las células de mamífero HEK-293, COS-7 y CaCo-2 se sembraron en placas de cultivo de 8 pozos (Lab-Tek® II CC2TM Chamber Slide, Nunc, 154941) a una concentración de 5×10^4 células en 300 μ L de medio de cultivo y las células THP1 y J774 se sembraron a razón de 10^5 células en la misma cantidad de medio. Luego de los tiempos de incubación especificados previamente, el sobrenadante se eliminó y se adicionaron 150 μ g/mL de los nanotubos de VP6 previamente diafiltrados en medio de cultivo durante 4 h. A continuación se eliminó el medio, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con formaldehído (Sigma, F8775) al 4% en PBS y se permeabilizaron con deoxicolato de sodio (Sigma, D6750) al 0.2% en PBS y 2% BSA (US Biologicals, A1310) en PBS. La inmunodetección de la proteína VP6 se realizó con el AcM 255/60 específico para VP6. Posteriormente las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 594 (Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG, Invitrogen, A-11005). Los núcleos celulares se tiñeron con SlowFade® *Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen, S36938) y el citoesqueleto de actina se visualizó mediante la incubación con faloidina acoplada al fluoróforo Alexa-488 (Alexa Fluor® 488 Phalloidin, Invitrogen, A12379). Las células se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss Axio observer acoplado a un sistema ApoTome para la generación de cortes ópticos (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Todas las imágenes se tomaron utilizando el mismo tiempo de exposición para cada fluoróforo. El análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software Axio Vision Rel 4.8 (Carl Zeiss). Alternativamente se utilizó el microscopio confocal Olympus FV1000 del LNMA (IBT) y se procesaron las imágenes utilizando el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

4.8 Inhibición de la entrada de los nanotubos de VP6 a macrófagos en presencia de inhibidores de la endocitosis.

Las células THP1 y J774 se sembraron en placas LabTek a una concentración de 10^5 células en 300 μ L de medio de cultivo RPMI suplementado con 5% SFB y se diferenciaron a macrófagos durante 96 y 48 h respectivamente mediante la adición del éster de forbol PMA

a una concentración de 50 ng/mL. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y las células se incubaron durante 2 h con diferentes concentraciones de Metil- β -ciclodextrina (M β CD) o de genisteína diluidas en medio de cultivo RPMI. Seguidamente las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se adicionaron 150 μ g/mL de los nanotubos de VP6 los cuales se incubaron junto a las células durante 4 h. Al cabo de este tiempo se eliminó el medio, las células se lavaron y se fijaron para su posterior inmunotinción como se describió previamente. Para estimar la cantidad de proteína VP6 internalizada en los macrófagos en presencia y ausencia de los inhibidores, utilizamos un programa desarrollado por el Dr. Arturo Pimentel del LNMA, IBT, UNAM denominado *Cell Internalization Estimator* (Anexo 1).

4.9. Reensamblaje de VP6 en presencia del plásmido pVAX1-EGFP

Los nanotubos de VP6 a una concentración de 650 μ g/mL se desensamblaron mediante la adición de CaCl₂ a una concentración final de 300 mM. El reensamblaje se realizó incubando 300 μ g de proteína desensamblada con 50 μ g de ADN en un volumen final de 1 mL durante 1 hora. Seguidamente la mezcla de VP6-ADN se diluyó 10 veces con una solución tampón a diferentes pHs y se concentró utilizando un sistema de ultrafiltración AMICON con una membrana de celulosa regenerada de 10KDa de tamaño de poro (Millipore, 13612). Las soluciones utilizadas fueron, para pH 8: Tris-HCl 10 mM, para pH 7: Tris-HCl 10 mM y para pH 5: NaAc-HAc 100 mM. Alternativamente, se utilizó una solución de 100 mM NaHCO₃ pH 8.3. Una vez concentradas las muestras se tiñeron con acetato de uranilo para su visualización en el MET y la presencia de ADN plasmídico se detectó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

4.9.1. Digestión del ADN plasmídico con Benzonasa

El plásmido pVAX1-EGFP sólo o en presencia de los nanotubos de VP6 fue digerido con Benzonasa a 50 U/mL (Sigma, E1014). La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C y posteriormente se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm. La presencia de ADN se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

5. Resultados

5.1. Obtención del plásmido pVAX1-EGFP

A partir del vector pCR8.TOPO-EGFP realizamos un ensayo de PCR utilizando los oligonucleótidos Forward y Reverse cuya secuencia se mostró previamente. La banda correspondiente al gen de la EGFP se amplificó (Figura 8A) y se clonó en el vector pCR2.1TOPO (Figura 8B).

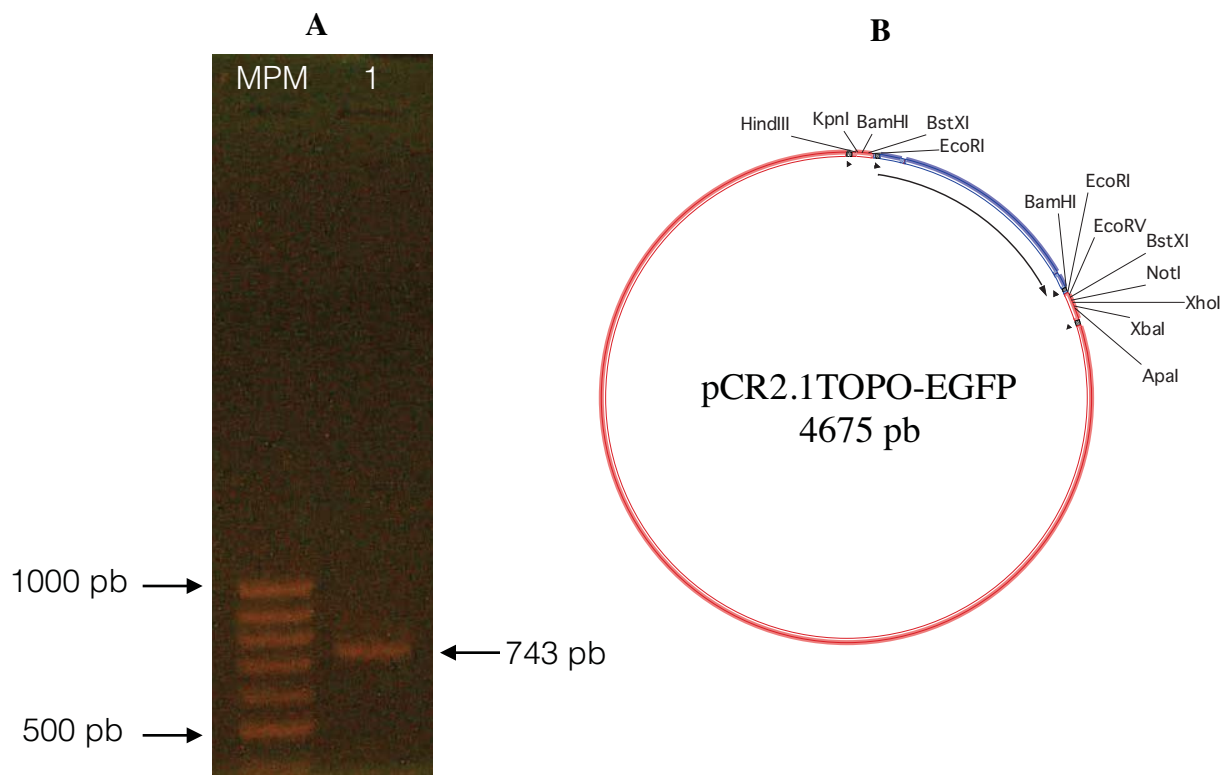


Fig.8. A. Gel de agarosa donde se muestra el resultado del PCR para amplificar el gen de la EGFP a partir del vector pCR8TOPO-EGFP. MPM: Marcador de peso molecular *Gene Ruler 100pb* (Invitrogen), 1: Banda correspondiente al gen de la EGFP. B. Esquema *in silico* de la construcción pCR2.1TOPO-EGFP. Las enzimas del sitio de múltiple clonaje se destacan en negritas y en azul se muestra la región codificante para la EGFP.

El producto de esta clonación se transformó en células de *E. coli*, las cuales se sembraron en medio LB sólido con kanamicina y X-gal para facilitar la selección de los transformantes (colonias blancas). Las colonias seleccionadas se sembraron en medio LB líquido y su ADN plasmídico se purificó y analizó utilizando las enzimas de restricción *Hind* III, *Eco*RI,

BamH I y *Nco* I (Figura 9). Como resultado de este análisis pudimos verificar que el gen que codifica para la EGFP se insertó de manera correcta en el vector pCR2.1TOPO, pues las bandas visualizadas en el gel coinciden con el patrón de restricción esperado: para *Hind* III una banda de 4675 pb correspondiente al plásmido linearizado, para *BamH* I una banda de 3894 pb y otra de 781 pb, para *EcoR* I una banda de 3913 pb y otra de 762 pb y para *Nco* I dos bandas muy similares en tamaño (2358 y 2317 pb). Nuestro siguiente paso consistió en extraer el gen de la EGFP de este vector para subclonarlo en el vector pVAX1. Esta construcción pCR2.1TOPO-EGFP así como el vector pVAX1 fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR* I y los fragmentos de interés se purificaron y aislaron a partir de un gel de agarosa (Figura 10).

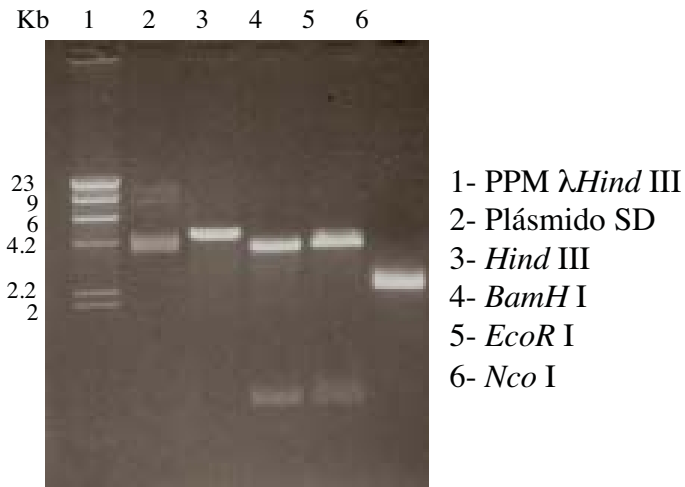


Fig. 9. Análisis de restricción del plásmido pCR2.1TOPO-EGFP. El plásmido digerido con las enzimas de restricción *Hind* III, *BamH* I, *EcoR* I y *Nco* I se visualizó mediante un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

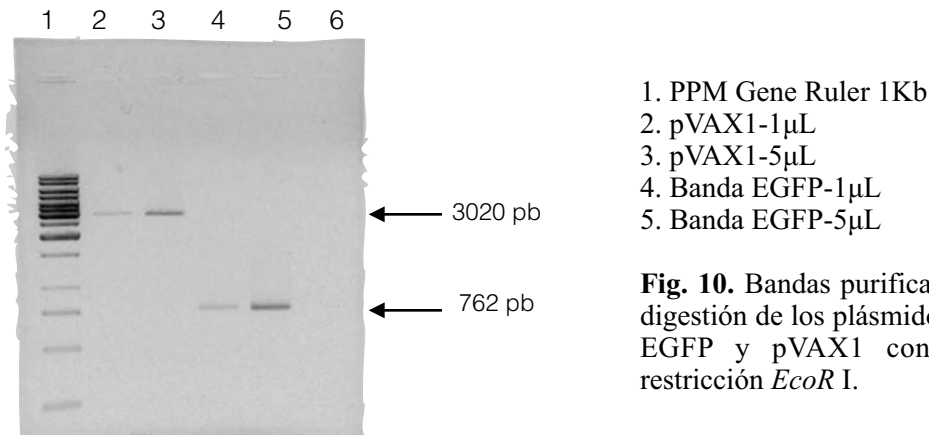


Fig. 10. Bandas purificadas a partir de la digestión de los plásmidos pCR2.1TOPO-EGFP y pVAX1 con la enzima de restricción *EcoR* I.

Materiales y Métodos

Las bandas purificadas del gel se ligaron y el producto de la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli*. Para seleccionar las colonias que presentaban el plásmido pVAX1-EGFP realizamos un ensayo de PCR utilizando los oligonucleótidos T7 Forward y Reverse. Como resultado de estos ensayos, de las 10 colonias analizadas obtuvimos dos (colonias 2 y 10) donde solamente se amplificó un fragmento de ADN del tamaño esperado (844 pb) (Figura 11). A partir de este resultado se seleccionaron las colonias 2 y 10, las cuales se sembraron en medio LB líquido para purificar el ADN plasmídico. La secuenciación del mismo confirmó que ambas presentan el gen de la EGFP insertado de manera correcta en el vector pVAX1 (Figura 12).

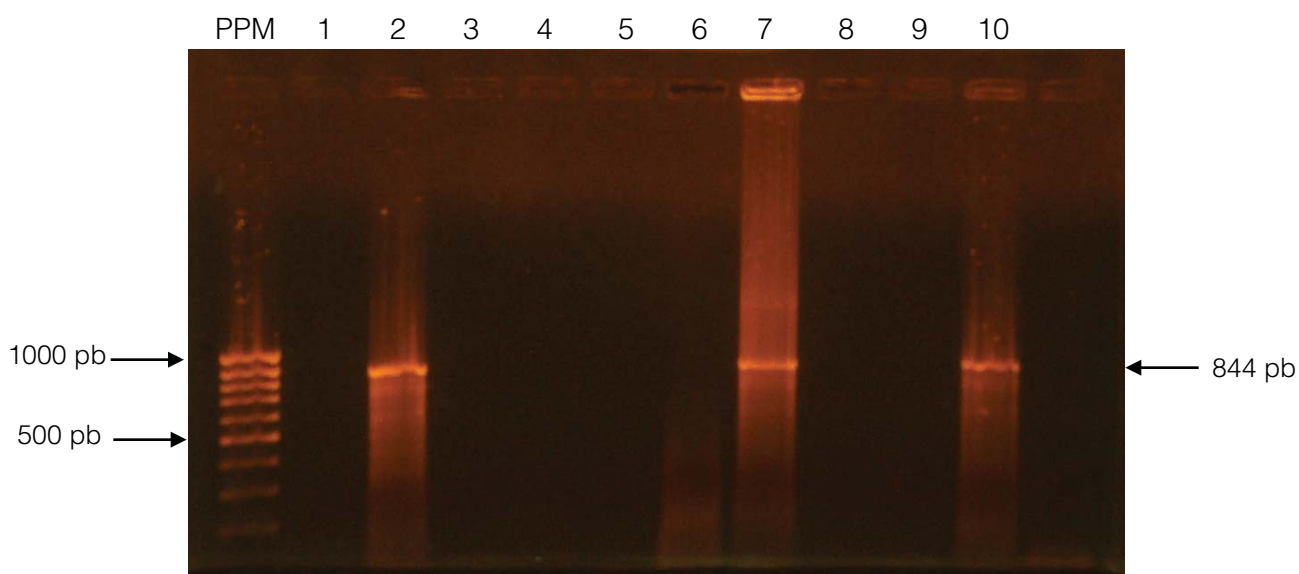


Fig. 11. Gel de agarosa donde se muestra el resultado del PCR para amplificar el gen de la EGFP a partir del vector pVAX1-EGFP. PPM: Patrón de peso molecular *Gene Ruler 100pb* (Invitrogen). 1-10: Visualización mediante tinción con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos a partir de las 10 colonias analizadas.

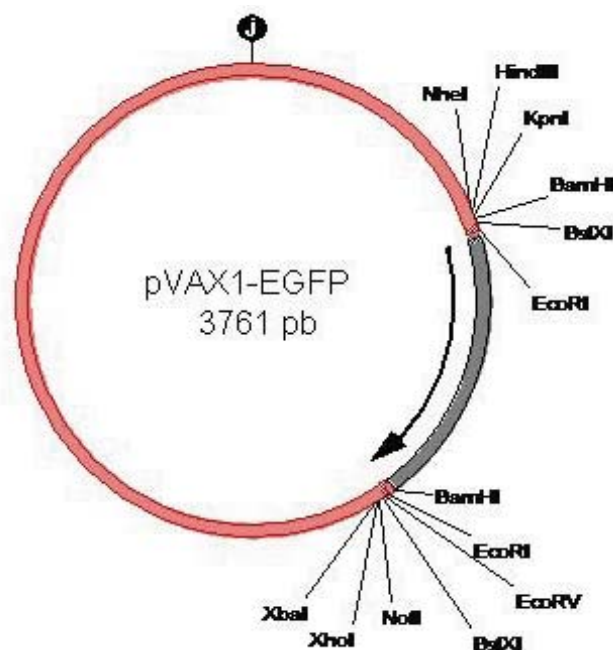


Fig.12. Construcción *in silico* del vector pVAX1-EGFP. En rojo se representa la secuencia del vector y en negro el gen de la EGFP. La flecha indica el sentido de la traducción. El sitio de múltiple clonaje del vector se muestra con las enzimas de restricción.

5.2 Producción y purificación de los nanotubos de VP6

Los nanotubos de VP6 utilizados en este trabajo se produjeron y purificaron como se describió previamente. Las fracciones colectadas de la cromatografía de intercambio aniónico y permeación en gel así como el sobrenadante de cultivo se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. En la Figura 13 carril 6 se observa una banda correspondiente a la proteína VP6 purificada, la cual coincide en tamaño con el control positivo (VP6 previamente purificada, carril 2). Esta banda además está libre de otras proteínas contaminantes. Estos resultados concuerdan con trabajos previos de nuestro grupo donde la proteína VP6 purificada presenta un porcentaje de pureza superior al 95% (Plascencia-Villa et al., 2011). Para determinar si contábamos con macroestructuras en la muestra purificada, analizamos el tamaño de las proteínas obtenidas mediante dispersión dinámica de luz utilizando un equipo Zeta Sizer Nano (*Malvern*). Como se observa en la Figura 14A, aproximadamente el 90% de la muestra corresponde a estructuras de 1 μ m de diámetro, lo cual corresponde al tamaño promedio esperado para los nanotubos de VP6 producidos mediante el sistema de células de insecto-baculovirus (Plascencia-Villa et al., 2011). El resto de los picos observados puede corresponder a agregados proteicos y/o a

nanotubos de menor tamaño que se fragmentaron como parte del proceso de purificación. En la Figura 14B se muestra la estructura de los nanotubos de VP6 purificados, los cuales se visualizaron mediante MET. A la mayor magnificación se observa el arreglo hexagonal característico de la proteína VP6 ensamblada en forma de nanotubos, el cual se ha documentado previamente (Lepault et al., 2001).

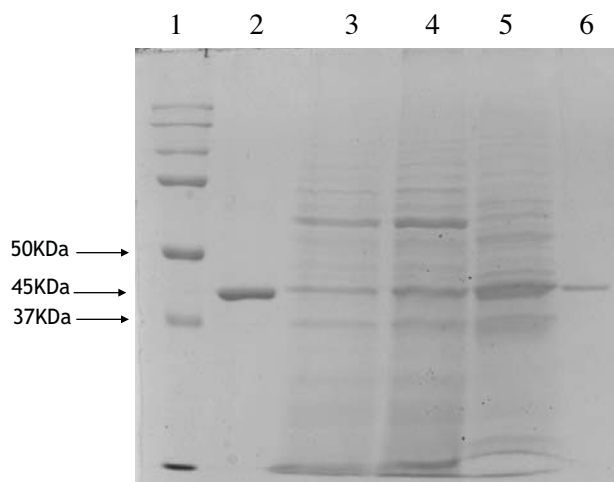


Fig. 13. Análisis por SDS-PAGE de las etapas de la purificación de los nanotubos de VP6. Las muestras previamente desnaturalizadas en presencia de β -mercaptoetanol se corrieron en un gel de acrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomasie para visualizar el contenido de proteína total. Carril 1: MPM *DualColor*, 2: VP6 control+, 3: Sobrenadante de cultivo, 4: Sobrenadante de cultivo concentrado, 5: pico1-Intercambio Ionico, 6: VP6 purificada (corresponde al pico 1 de cromatografía de exclusión molecular).

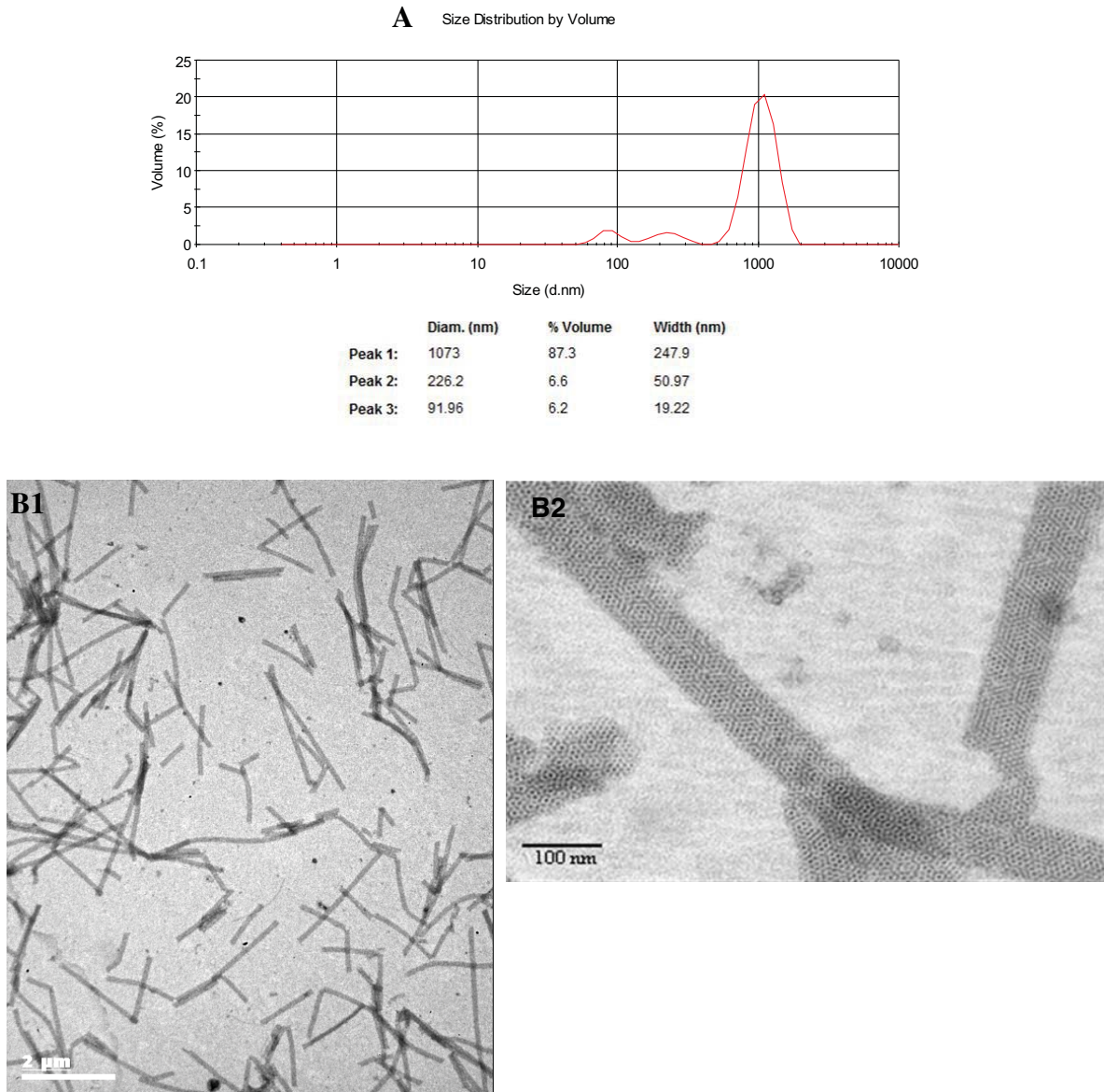


Fig.14. Análisis del tamaño de los nanotubos de VP6 purificados mediante dispersión dinámica de luz (A) y microscopía electrónica de transmisión (B). A: se muestra el diámetro promedio de las estructuras proteicas presentes (de una esfera equivalente) y el porcentaje que representan de la muestra total. B: Nanotubos de VP6 teñidos con acetato de uranilo y visualizados mediante microscopía electrónica a 80Kv (B1: aumento de 7 000X, B2: 100 000X).

5.3 Citotoxicidad de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero

Para determinar la toxicidad de los nanotubos de VP6, se adicionaron diferentes concentraciones de los mismos (150-12.5 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a 3.3-0.28 μM) a líneas celulares de mamífero de diferentes orígenes, las cuales se cultivaron hasta alcanzar la confluencia. Seguidamente se adicionó el compuesto MTT como se describió previamente. Las concentraciones y tiempos de incubación analizados se escogieron a partir de los valores reportados en la literatura donde se evaluó la internalización de diferentes moléculas como polímeros, péptidos y partículas pseudovirales en diferentes líneas celulares de mamífero como HepG2, COS-7 y HeLa. Las concentraciones de estos agentes acarreadores se reportan desde el orden de nano Molar a los 20 μM y los tiempos de incubación oscilan desde los 20 min hasta las 24 h o más (Touzé y Coursaget, 1998; Jensen et al., 2001; Touzé et al., 2001; Suh et al., 2003; Watkins et al., 2009). En la Figura 15 se observa que los nanotubos de VP6 no son citotóxicos a las concentraciones y tiempo analizados para las líneas celulares estudiadas, ya que en todos los casos la viabilidad celular normalizada con respecto a las células incubadas sólo con medio de cultivo se mantuvo por encima del 80%. No obstante, existen diferencias entre los resultados de viabilidad relativa que se muestran dependiendo de la línea celular en cuestión, observándose una menor afectación en este parámetro en las células CaCo-2 y J774. Los nanotubos de VP6 también se incubaron con las células MA104, COS-7 y CaCo-2 durante 24 h y en todos los casos la viabilidad celular normalizada se mantuvo por encima del 60% (datos no mostrados).

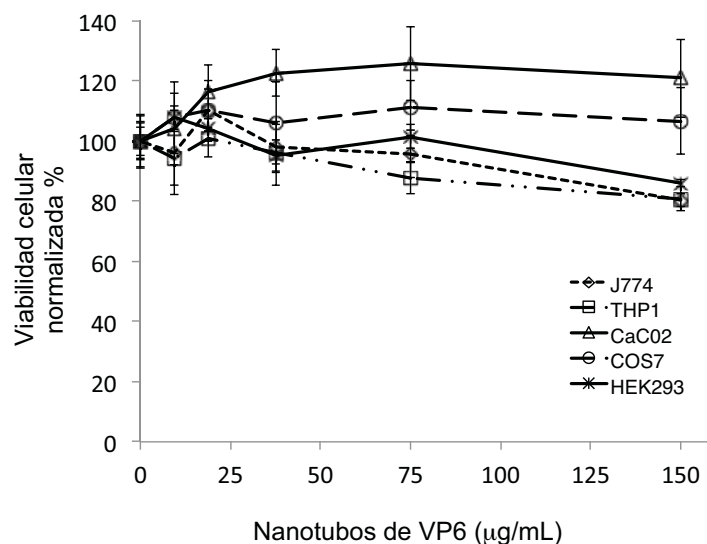


Fig. 15. Viabilidad celular relativa de CaCo-2, HEK-293, COS-7, THP1 y J774 incubadas durante 4 h con los nanotubos de VP6. La viabilidad celular normalizada se calculó tomando como 100% la señal obtenida en células incubadas sólo con medio de cultivo. Las barras de error indican la desviación estándar de ocho réplicas para cada concentración de nanotubos de VP6 analizada.

5.4 Internalización de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero

Para estudiar la capacidad de los nanotubos de VP6 como acarreadores de ADN era necesario conocer si podían ser internalizados en células de mamífero. Para ello los nanotubos de VP6 se diafiltraron en medio de cultivo y se incubaron durante 4 h con las líneas celulares previamente mencionadas. Como se muestra en la Figura 16, los nanotubos de VP6 no se internalizaron en las líneas celulares HEK-293, COS-7 ni CaCo-2. Para las células HEK-293 y COS-7, el contorno celular se visualizó utilizando campo claro, y el contorno de las células CaCo-2 se observó mediante la tinción del citoesqueleto de actina (verde). En estas tres líneas celulares se muestra que la señal de fluorescencia en rojo correspondiente a la inmunodetección de VP6 se localiza en el exterior de las células. Un resultado diferente se obtuvo cuando los nanotubos de VP6 se incubaron con las células THP1 y J774, en las que se detectó proteína VP6 internalizada (Figura 17 A y C). En este caso la señal de fluorescencia en rojo se localizó principalmente en el interior celular, ubicada cerca del núcleo en las células THP1 y cercana a la membrana plasmática en las células J774. Con el objetivo de corroborar si la señal de VP6 proviene del interior celular, se realizaron cortes ópticos a diferentes profundidades del eje Z utilizando el sistema

ApoTome (Figura 17, E). La realización de cortes ópticos nos permitió generar una vista ortogonal de las células que muestra que la señal roja se encuentra distribuída a través del eje Z de simetría, el cual representa la profundidad del citoplasma delimitado por el citoesqueleto de actina visualizado de color verde. En esta imagen también observamos que la distribución de la fluorescencia en rojo coincide en el eje Z con la distribución del núcleo celular, representado en azul.

Para el caso de las células THP1, éstas fueron diferenciadas previamente de monocitos a macrófagos mediante la adición del PMA. En el caso de las células J774, aunque éstas son macrófagos de ratón, los ensayos de incubación con los nanotubos de VP6 sin activar con PMA mostraron a los nanotubos (rojo) adheridos al exterior celular pero sin ser internalizados (Figura 18, A y B). No fue hasta diferenciar las células J774 con PMA durante 48 h que se observó la señal en rojo derivada de la inmunodetección de la proteína VP6 en el interior celular (Figura 18, C y D).

Para determinar si la entrada de la proteína VP6 a los macrófagos dependía de su organización en nanotubos, las células THP1 y J774 previamente diferenciadas con PMA fueron incubadas con proteína VP6 desnaturalizada en presencia de SDS y calor o con partículas pseudovirales de doble capa de rotavirus (GFP-VP2/VP6). Las partículas de doble capa (DLPs) presentan un diámetro aproximado de 70 nm y fluorescen en color verde debido a la presencia de GFP fusionada a VP2. En la figura 19A se muestra un ensayo de Western Blot donde se detectó la presencia de VP6 desnaturalizada y diafiltrada en medio de cultivo RPMI. La banda correspondiente a la proteína VP6 desnaturalizada (carril 3) tiene un peso de 45 KDa y presenta el mismo patrón de migración que la proteína VP6 utilizada como control positivo (carril 2). Esta muestra además se analizó mediante dispersión dinámica de luz (DDL) para corroborar la desnaturalización de los nanotubos de VP6 con SDS (Figura 19B). La línea roja muestra que el diámetro promedio de la proteína desnaturalizada está entre 7 y 9 nm, lo cual corresponde a monómeros de VP6 (Matiheu et al., 2001), lo que difiere de la distribución representada en la línea verde con un diámetro promedio de 2 μ m, la cual corresponde a los nanotubos de VP6 diluidos en medio de cultivo. En la Figura 19C se muestra un ensayo de Western Blot para detectar la presencia de las proteínas VP6 y VP2 en la fracción correspondiente a las DLPs purificadas. En el carril 3 se observa una banda de 45 KDa correspondiente a VP6 y una banda de 120 KDa

correspondiente a la fusión GFP-VP2. Como control positivo se utilizó VP6 purificada (carril 2). Esta muestra también se analizó mediante DDL para corroborar el tamaño de las DLPs (Figura 19D). Las líneas roja y negra representan dos diluciones de las DLPs, las cuales muestran que aproximadamente el 70% de la población tiene un tamaño promedio de 75nm, que corresponde al tamaño de las DLPs y otra población mayor que presenta un tamaño promedio de 500nm que puede estar constituida por agregados de DLPs.

En la figura 20 se muestran las células THP1 (A y B) y J774 (C y D) incubadas con la proteína VP6 desnaturalizada, la señal en rojo correspondiente a la inmunodetección de VP6 se observa en la superficie celular. Para corroborar que la señal roja proveniente de la detección de VP6 desnaturalizada no se distribuye en el interior celular, se realizaron cortes ópticos y se generaron las vistas ortogonales, las cuales se muestran en la figura 20 (A al D). En este caso la señal de fluorescencia en rojo mostrada en los ejes XZ y YZ se observa solamente en el contorno celular, delimitado en verde por el citoesqueleto de actina. Cuando los macrófagos fueron incubados con DLPs, no se observó señal en verde en el interior celular, lo cual indica que en las condiciones y tiempos analizados no se internalizaron las esferas de GFP-VP2/VP6 (Figura 21, THP1: A y B; J774: C y D, respectivamente). No obstante, para corroborar este resultado, se debe realizar una inmunodetección de la proteína GFP con un anticuerpo específico, para descartar que se haya afectado la fluorescencia de GFP durante la realización de los ensayos de internalización.

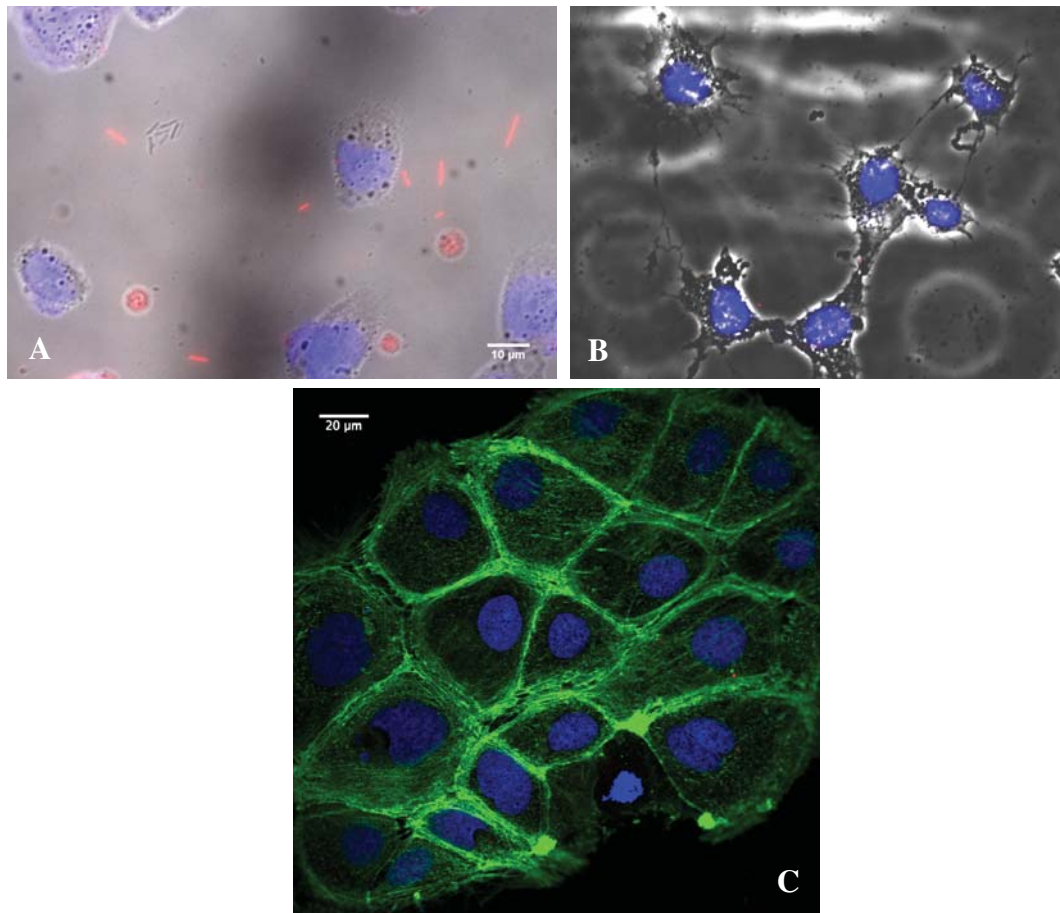


Fig.16. Inmunodetección de VP6 en células de mamífero. Panel A: HEK-293, B: COS-7, C: CaCo-2. Las células se incubaron durante 4 h con los nanotubos de VP6 a una concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La presencia de VP6 se detectó con el AcM 255/60 seguido de un anticuerpo policlonal anti-ratón acoplado a Alexa 594 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). En las células CaCo-2 el citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina acoplada a Alexa-488 (verde) y el contorno celular para las líneas HEK-293 y COS-7 se observó con el campo claro.

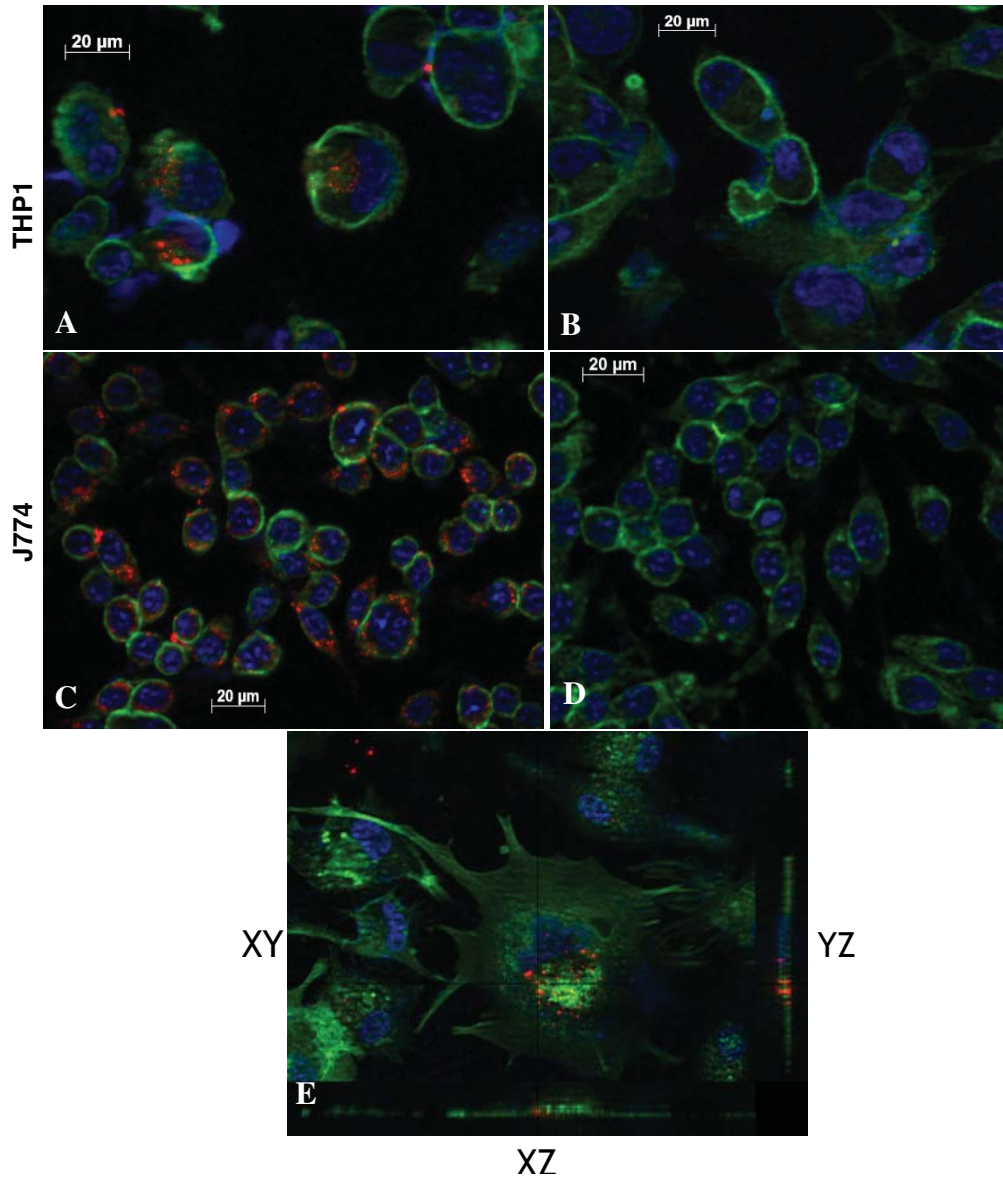


Fig.17. Internalización de nanotubos de VP6 en macrófagos diferenciados con PMA. Las células de los paneles A y C se incubaron durante 4 h con los nanotubos de VP6 a una concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En los paneles B y D se muestran células incubadas solamente con medio de cultivo. En el panel E se muestra una proyección ortogonal de una célula THP1 incubada con los nanotubos de VP6 (resultado de 14 cortes ópticos en el eje Z). La presencia de VP6 se detectó con el AcM 255/60 y con un anticuerpo policlonal anti-ratón acoplado a Alexa-594 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina acoplada a Alexa-488 (verde).

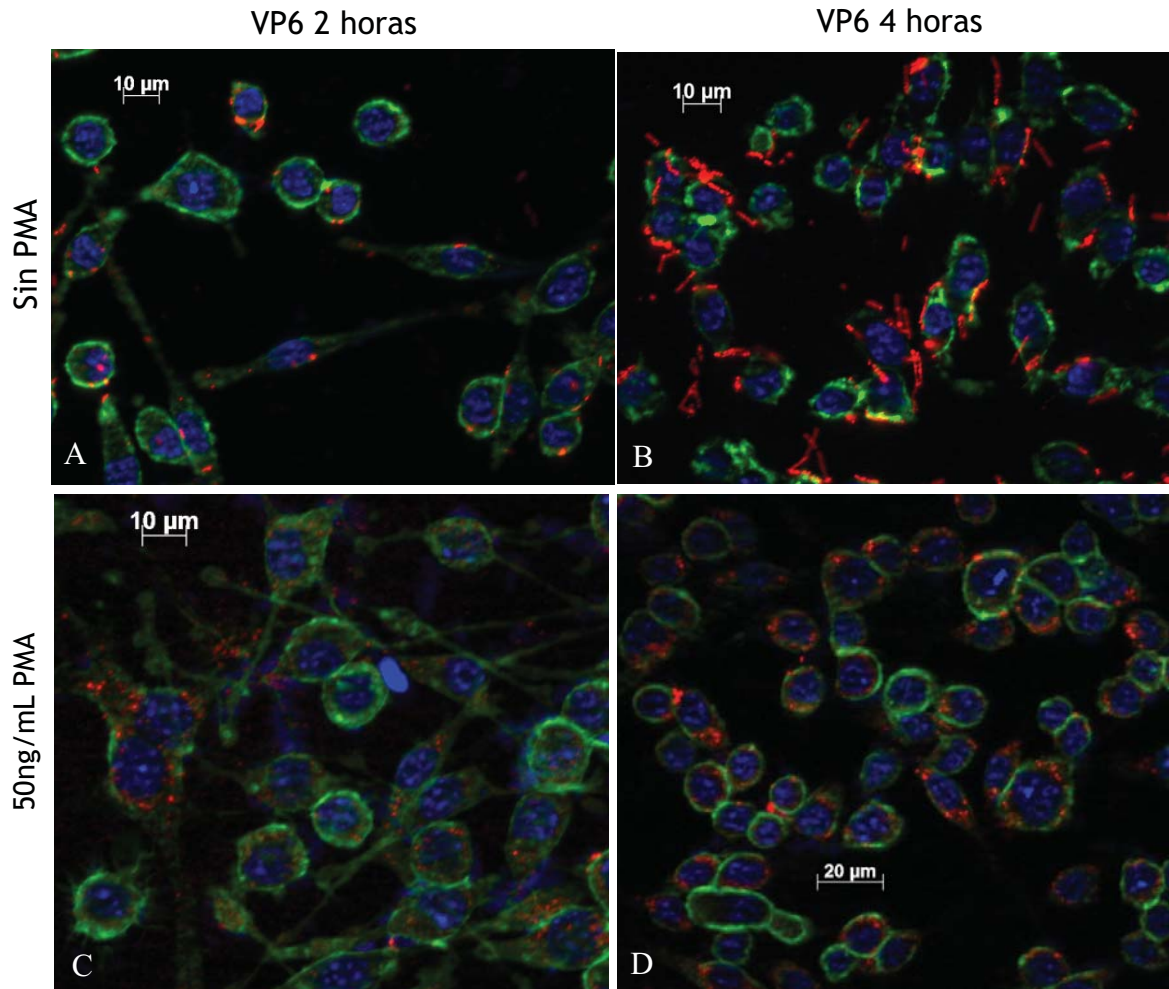


Fig. 18. Internalización de nanotubos de VP6 en células J774. Las células J774 sin diferenciar (A y B) o previamente diferenciadas con PMA (C y D) se incubaron durante diferentes tiempos con 150 µg/mL de los nanotubos de VP6. En rojo se muestra la presencia de VP6, en azul se observan los núcleos celulares y en verde se aprecia el citoesqueleto de actina.

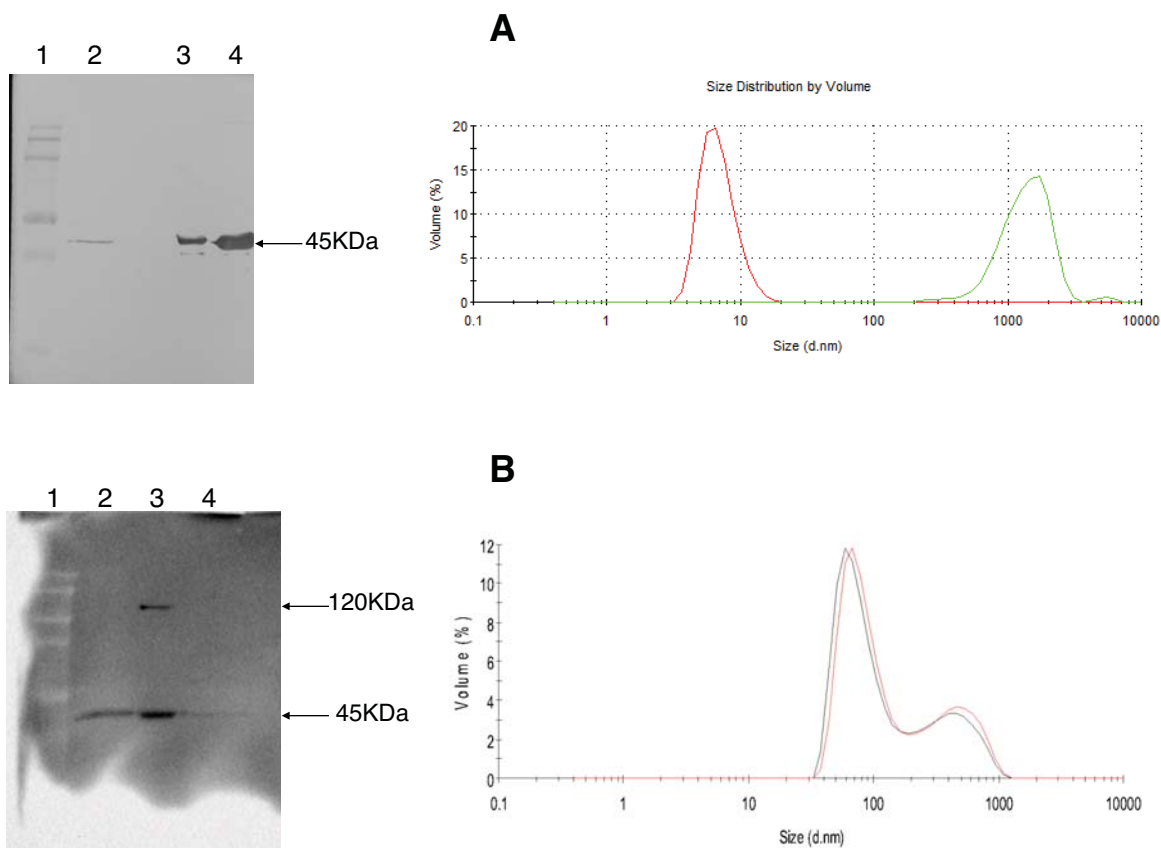


Figura 19. Análisis de la proteína VP6 desnaturalizada y de las DLPs purificadas mediante Western Blot y DDL. **A. Western Blot**, 1: MPM *Dual Color*, 2: VP6 control (+), 3: VP6 tratada con SDS y calor en RPMI, 4: nanotubos de VP6. Las muestras fueron previamente hervidas en presencia de β -mercaptoetanol. Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo anti-rotavirus (1:5000) y seguidamente se utilizó un suero de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (1: 1000). **A. Gráfica**, Análisis mediante DDL de las muestras de VP6 tratada con SDS (rojo) y nanotubos de VP6 (verde) en medio RPMI. **B. Western Blot**, 1: PPM *Dual Color*, 2: VP6 control (+), 3: DLPs purificadas, 4: nanotubos de VP6. Las muestras fueron previamente hervidas en presencia de β -mercaptoetanol. Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo anti-rotavirus (1:5000) para detectar VP6 y un anticuerpo anti-GFP (1:2000) para detectar GFP-VP2. Como segundo anticuerpo se utilizó un suero de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (1: 1000) y un suero de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa (1: 1000). **B. Gráfica**, Análisis mediante DDL de las DLPs purificadas. En rojo y negro se muestran dos diluciones de la misma muestra.

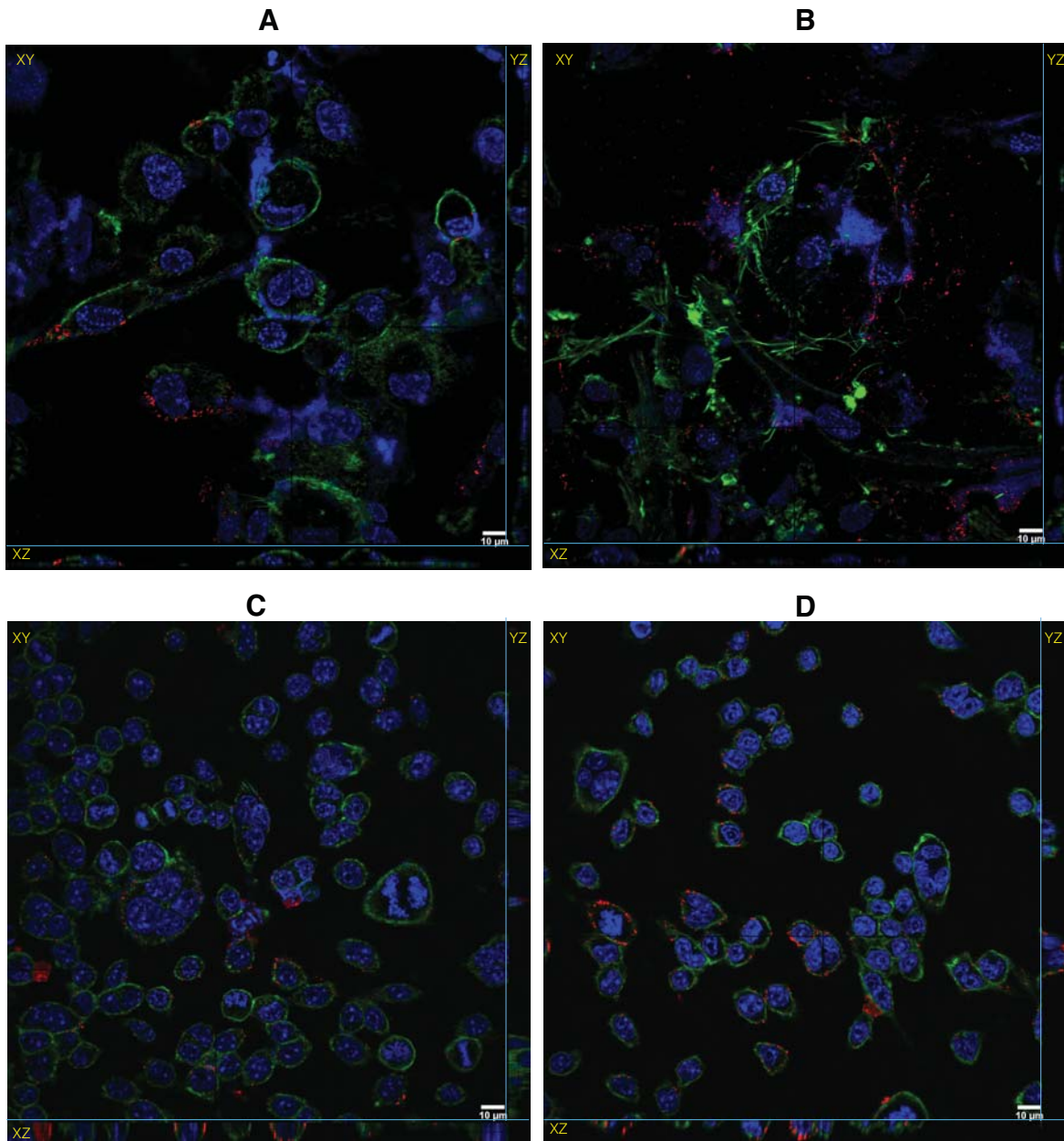


Fig. 20. Interacción de VP6 desnaturalizada con células THP1 y J774. A y B: células THP1 incubadas con 150 $\mu\text{g/mL}$ de VP6 desnaturalizada durante 2 h y 4 h, respectivamente. C y D: células J774 incubadas con 150 $\mu\text{g/mL}$ de VP6 desnaturalizada durante 2 h y 4 h, respectivamente. La presencia de VP6 se detectó utilizando el AcM 255/60 y el anticuerpo policlonal anti-ratón acoplado a Alexa-594 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-Alexa 488 (verde).

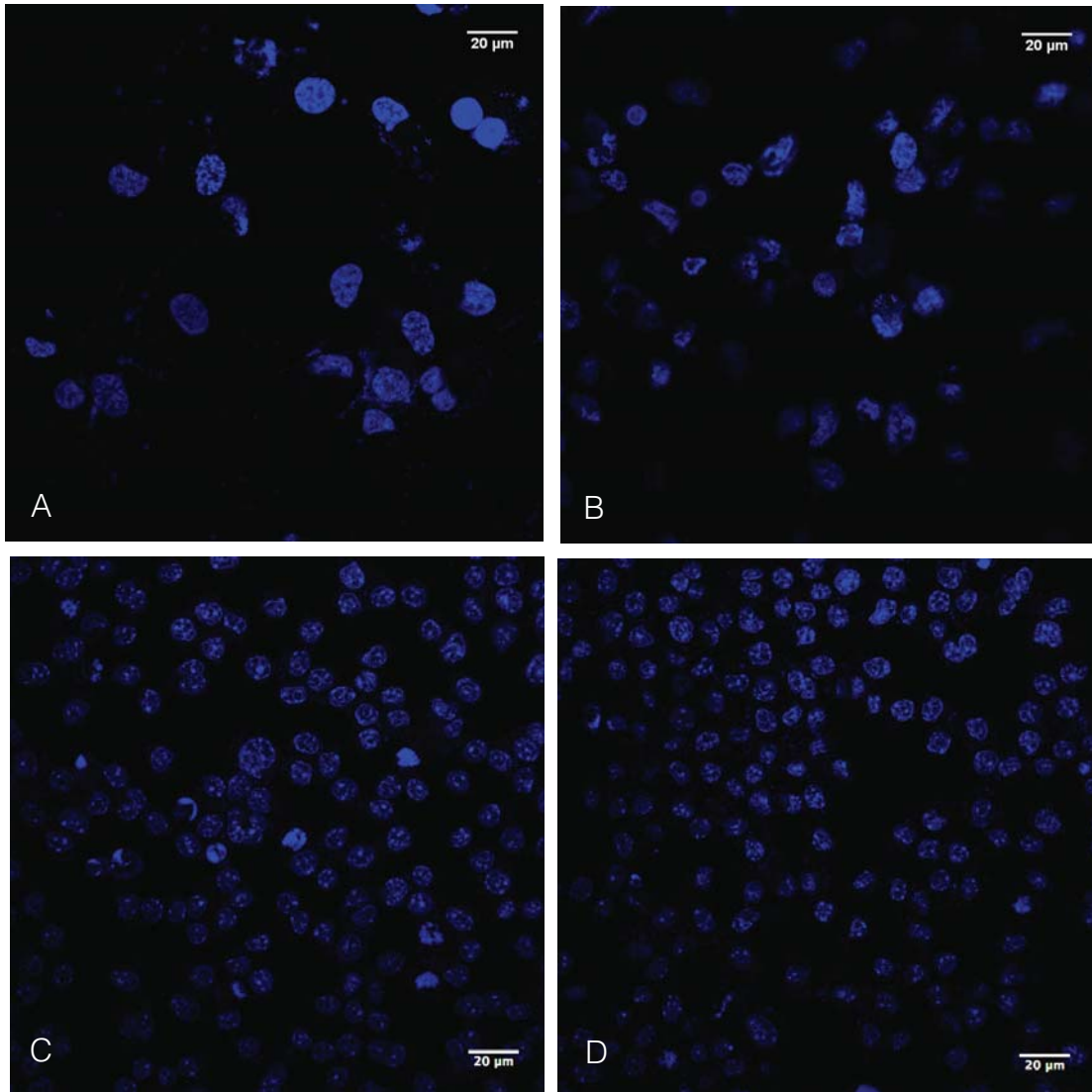


Fig. 21. Interacción de partículas pseudovirales de doble capa GFP-VP2/VP6 (DLPs) con macrófagos. En los paneles A y B se muestran las células THP1 incubadas con 150 µg/mL de las DLPs durante 2 h y 4 h, respectivamente. En los paneles C y D se muestran las células J774 incubadas con la misma cantidad de DLPs durante 2 h y 4 h, respectivamente. Las PPVs 2/6 se visualizan en verde por presentar GFP. Los núcleos celulares se visualizaron con DAPI (azul).

5.5 Citotoxicidad de los inhibidores de endocitosis M β CD y genisteína sobre las líneas celulares THP1 y J774.

Se procedió a estudiar el efecto de algunos inhibidores de la endocitosis como la M β CD y la genisteína sobre el proceso de internalización de los nanotubos de VP6 en células THP1 y J774 con el objetivo de profundizar en el mecanismo de entrada de los nanotubos a estas líneas celulares. Las ciclodextrinas se utilizan para disolver compuestos grasos de baja solubilidad en agua y han sido utilizadas como inhibidores de la endocitosis debido a que sequestran el colesterol de las membranas. La genisteína es un inhibidor de tirosin-quinasas, por lo que se usa para inhibir tanto la fagocitosis como la macropinocitosis y la internalización de compuestos dependiente de caveolina (Mayor y Pagano, 2007; Vercauteren et al., 2010).

Como un primer paso en el uso de estos inhibidores es necesario conocer el grado de toxicidad que presentan sobre las células THP1 y J774. Para ello ambos inhibidores se disolvieron en medio de cultivo RPMI sin SFB y se incubaron durante 2 h a diferentes concentraciones con las células THP1 y J774 previamente diferenciadas con PMA. Las concentraciones de inhibidor utilizadas se escogieron tomando en cuenta los reportes previos de la literatura (Ghosh et al., 2002; Palmbois et al., 2002; Nagao et al., 2010; Vercauteren et al., 2010). Posteriormente se adicionó una solución de MTT. Como se observa en la figura 22A, la M β CD no es citotóxica para ninguna de las líneas celulares al tiempo y concentraciones analizadas, ya que la viabilidad relativa se mantuvo por encima del 80%. Sin embargo, la genisteína provocó una disminución de la viabilidad celular relativa hasta el 40% en las células THP1 a partir de los 200 μ M (Figura 22B), por lo que para nuestros experimentos de inhibición decidimos trabajar a concentraciones de 100 μ M de genisteína o menores. Estos resultados concuerdan con otros reportes donde se ha estudiado la citotoxicidad de las ciclodextrinas y de la genisteína sobre otras líneas celulares de mamífero, por ejemplo en células COS-7, Vero y RAW264.7 (Díaz-Moscoso et al., 2010, Gerondopoulos et al., 2010, Vercauteren et al., 2010).

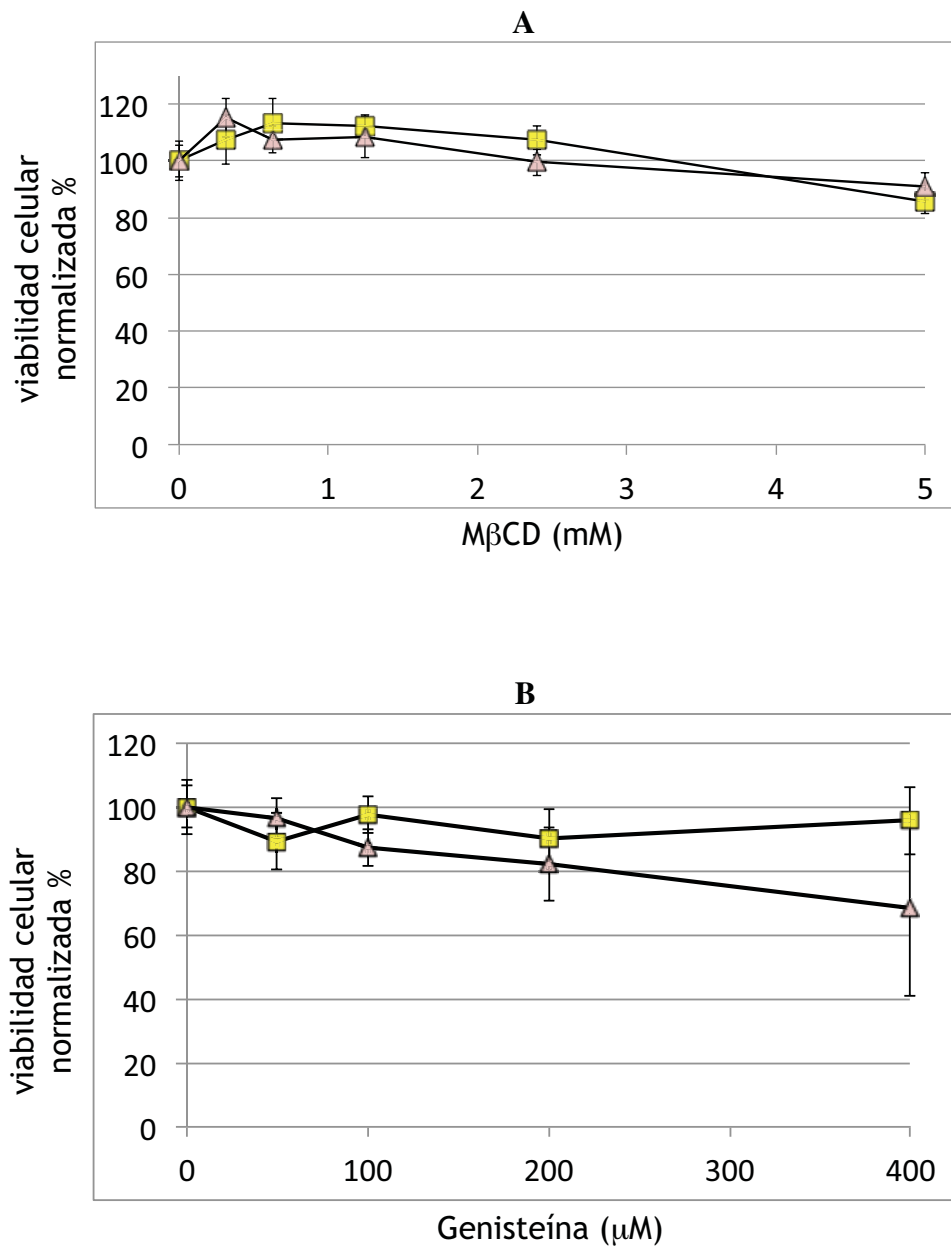


Fig. 22. Citotoxicidad de los inhibidores de endocitosis Metil-β-ciclodextrina y Genisteína sobre las líneas celulares THP1 (rosa) y J774 (amarillo). Las células se incubaron durante 4 h con los inhibidores y la viabilidad celular se calculó relativa a la señal de las células incubadas solamente con medio de cultivo (concentración del 100%).

5.6 Internalización de los nanotubos de VP6 en presencia de inhibidores de la endocitosis metil- β -ciclodextrina y genisteína

Con el objetivo de entender el mecanismo de entrada de los nanotubos de VP6 en macrófagos, procedimos a estudiar el efecto de algunos inhibidores de la endocitosis como la M β CD y la genisteína sobre este proceso. Ambos compuestos han sido ampliamente caracterizados y actúan sobre diferentes etapas del proceso endocítico. En estos ensayos tanto las células THP1 como las J774 fueron incubadas con concentraciones crecientes de M β CD (0.32, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mM) o de genisteína (50 y 100 μ M) durante 2 h previas a la adición de los nanotubos de VP6. Como resultado de estos ensayos observamos que para ambas líneas celulares, la adición de M β CD provocó una disminución de la entrada de los nanotubos de VP6 a concentraciones por encima de 1.25 mM (Figura 23, D, E y F; Figura 24, C, D y E). En ambos casos se observa que la señal de fluorescencia en rojo, que se localizaba en el interior de la célula, comienza a visualizarse hacia el exterior celular a medida que incrementa la concentración de la ciclodextrina, lo que sugiere que la presencia de colesterol en la membrana plasmática de los macrófagos, y probablemente la asociación de ciertos receptores en balsas lipídicas, se requieren para la internalización de los nanotubos de VP6. En concordancia con nuestros resultados, Nagao y colaboradores (2010) reportaron que la adición de M β CD inhibió la entrada de micropartículas de poliestireno de 3 μ m de diámetro a células J774, sugiriendo que el proceso de internalización se llevó a cabo por fagocitosis dependiente de receptores localizados en balsas lipídicas.

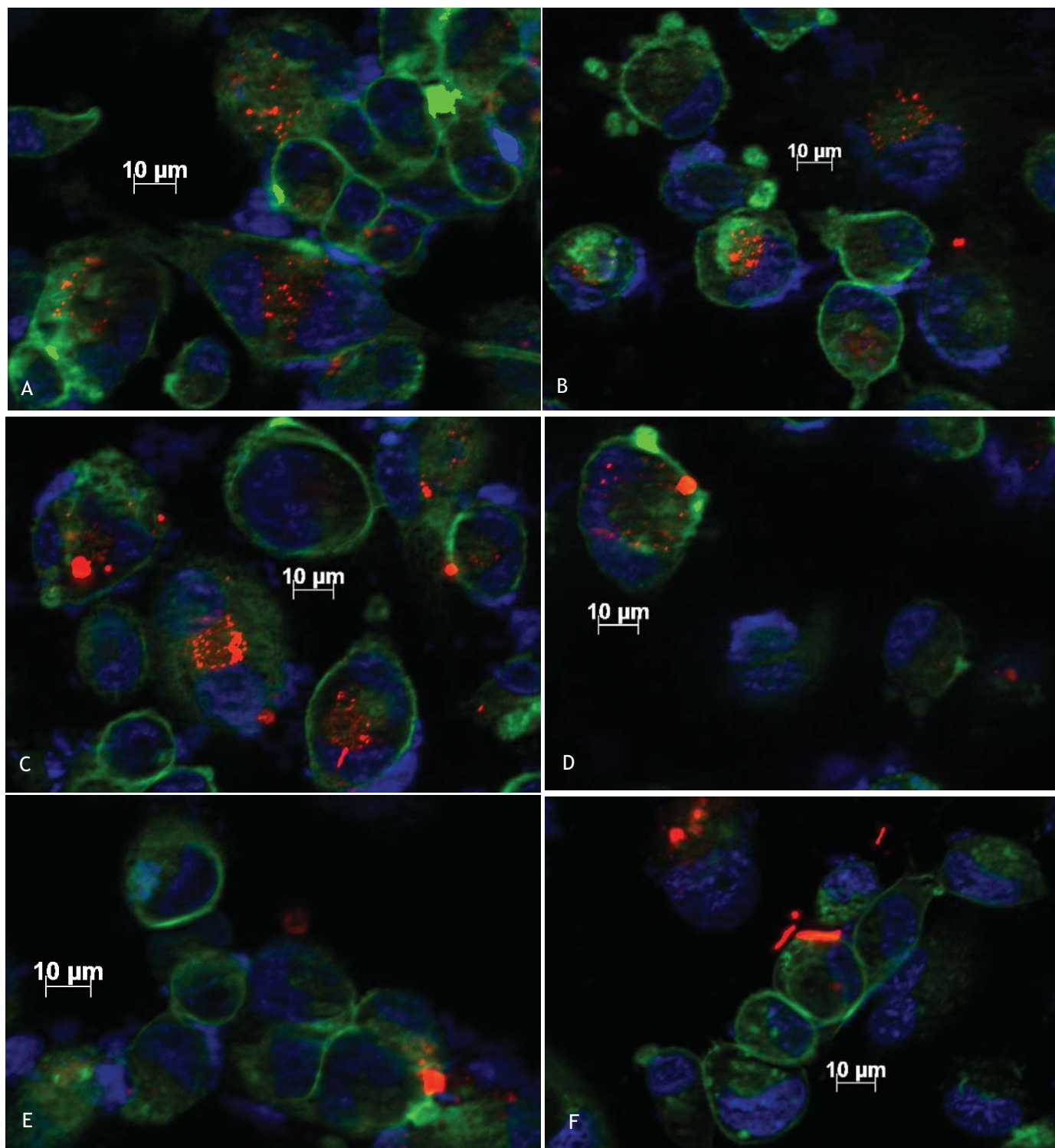


Fig. 23. Efecto de la adición de M β CD en la internalización de los nanotubos de VP6 en células THP1. Las células se incubaron durante 2 h con concentraciones crecientes de M β CD (A: 0, B: 0.312 mM; C: 0.625 mM, D: 1.25 mM, E: 2.5 mM, F: 5 mM) y luego se adicionaron 200 μ L de los nanotubos de VP6 a 150 μ g/mL durante 4 h. La presencia de VP6 se detectó utilizando el AcM 255/60 y un anticuerpo policlonal anti-ratón Alexa 594 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-Alexa 488 (verde).

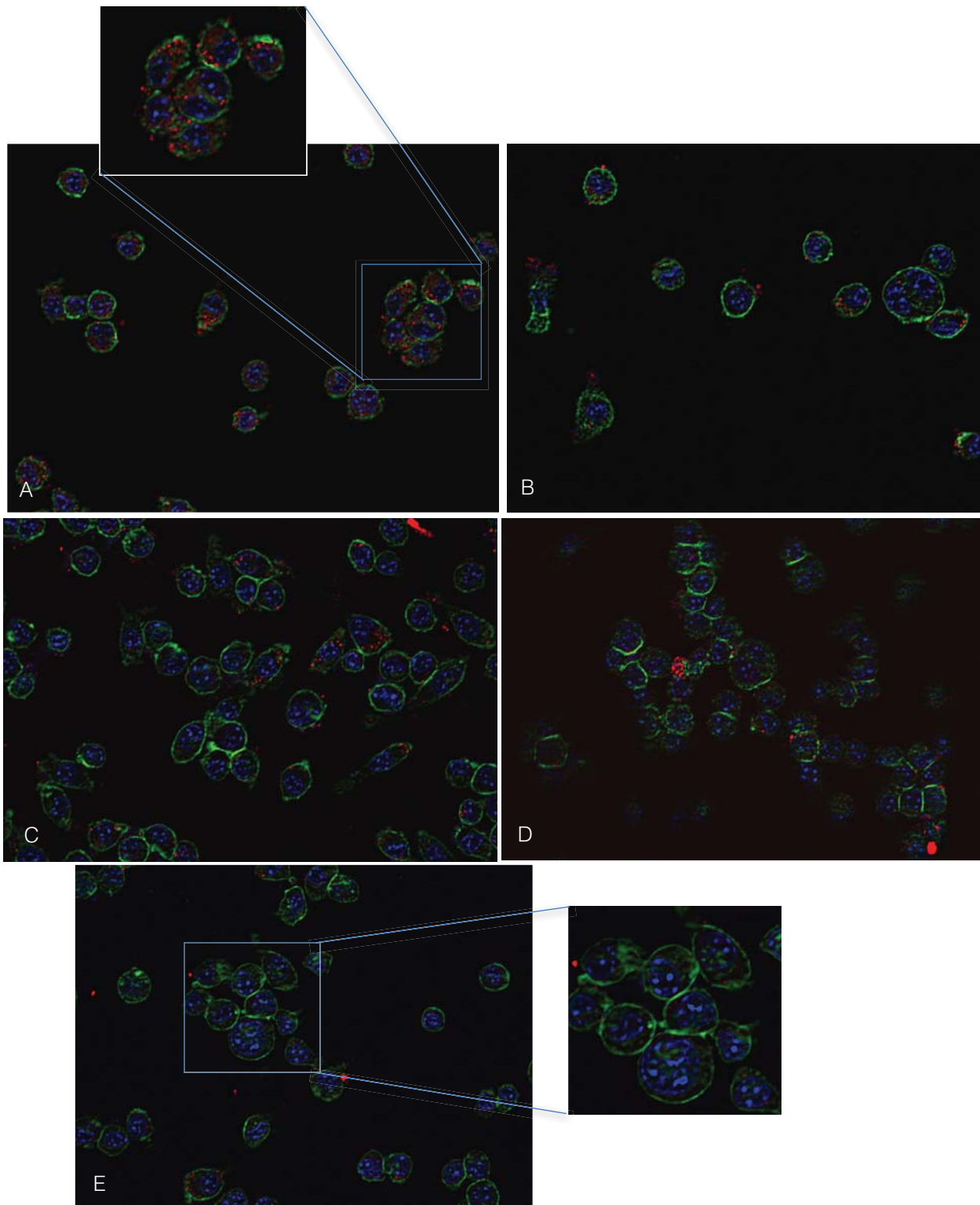


Fig. 24. Influencia de la adición de M β CD en la internalización de los nanotubos de VP6 en células J774. Las células se incubaron durante 2 h con diferentes concentraciones de M β CD (A: 0, B: 0.312 mM, C: 1.25 mM, D: 2.5 mM, E: 5 mM) y luego se adicionaron 200 μ L de los nanotubos de VP6 a 150 μ g/mL. La detección de VP6 se realizó con el AcM 255/60 y un suero policlonal anti-ratón Alexa 594 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-Alexa 488 (verde).

Con el objetivo de determinar la cantidad de proteína VP6 localizada en el interior de los macrófagos, se desarrolló un programa llamado *Cell Internalization Estimator*, el cual nos permite estimar el porcentaje de área celular ocupada por VP6 (Pimentel JA, 2014). Este programa calcula el área ocupada por los píxeles de cada uno de los canales analizados (rojo, verde y azul) y calcula la relación entre los píxeles que coinciden en la misma localización XY, por ejemplo rojo/verde, que en nuestro caso resulta importante pues nos da una estimado de la señal roja proveniente de la inmunodetección de VP6 que coincide con el área ocupada por las células, la cual se asoció a la presencia del citoesqueleto de actina (verde). En la Figura 25 se muestra el porcentaje de área celular ocupada por VP6 en las líneas celulares THP1 y J774.

En las gráficas A y B las barras verdes muestran el área ocupada por las células (μm^2) y las barras rojas representan el área de píxeles rojos que coincide en el plano XY con los píxeles verdes (μm^2). Teniendo en cuenta que el número total de células en cada fotografía no es el mismo, el % de internalización se definió como el área de píxeles rojos que coinciden con píxeles verdes dividido entre el área total de píxeles verdes. Como se observa en la Figura 25 C y D, la cantidad de proteína VP6 detectada en el interior celular disminuye a concentraciones de M β CD mayores a 1.25 mM para las células THP1 y mayores a 2.5 mM para las células J774. Contrariamente a lo observado para la M β CD, la adición de genisteína no inhibió la entrada de los nanotubos de VP6 a células THP1 ni J774 a ninguna de las concentraciones analizadas. En la Figura 26 se muestra el resultado de la estimación de la cantidad de proteína VP6 internalizada en células THP1 a concentraciones de 50 y 100 μM de genisteína. La gráfica muestra una tendencia a que aumente la cantidad de proteína internalizada en presencia del inhibidor, lo cual se corresponde con lo observado en las micrografías B y C, donde la señal de fluorescencia en rojo correspondiente a VP6 se mantiene en el interior celular en ambos casos. El resultado de la estimación de la cantidad de VP6 internalizada en células J774 en presencia de genisteína utilizando el programa *Cell Internalization Estimator* muestra también una mayor internalización de VP6 a 100 μM de genisteína (Figura 27, gráfica B). En las micrografías B, C y D de la Figura 27 también se observa que la señal roja que corresponde a VP6 se mantienen en el interior de las células tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor. Este resultado coincide con reportes previos en los que la adición de genisteína no inhibe la entrada de determinadas moléculas

en células de mamífero, por ej, la transferrina humana, la cual mostró una mayor internalización en células ARPE-19 (células epiteliales de retina humana) en presencia de 400 μM de genisteína (Vercauteren et al., 2010). No obstante, se deben realizar más réplicas del experimento con el fin de comprobar estadísticamente si la adición de genisteína incrementa la entrada de los nanotubos de VP6 a los macrófagos.

Nuestros resultados también muestran que la cantidad de VP6 internalizada fue mayor en células J774 que en células THP1, no obstante, la distribución de VP6 en el interior celular fue diferente para ambas líneas. En las células THP1, la señal en rojo proveniente de VP6 se localiza en la región perinuclear, sin embargo en las células J774 la proteína VP6 se distribuye cercana a la membrana citoplasmática. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran a los nanotubos de VP6 como posibles candidatos para la entrega de material genético a células de mamífero debido a su baja toxicidad y a su capacidad de ser internalizados en macrófagos. Para determinar si los nanotubos de VP6 pueden ser utilizados como acarreadores de ADN debemos evaluar primeramente su capacidad de encapsular ADN plasmídico en su interior, esto con el fin de proteger al ácido nucleico de la degradación por las enzimas presentes tanto en el medio extracelular como en el citosol. De lograrse la encapsulación de ADN dentro de los nanotubos de VP6, se procederá a evaluar si éste fue internalizado con éxito en las células de mamífero mediante la medición de la expresión del gen reportero EGFP, el cual se clonó previamente en el vector pVAX1. A continuación se muestran los ensayos que realizamos para evaluar la capacidad de los nanotubos de VP6 de encapsular ADN plasmídico.

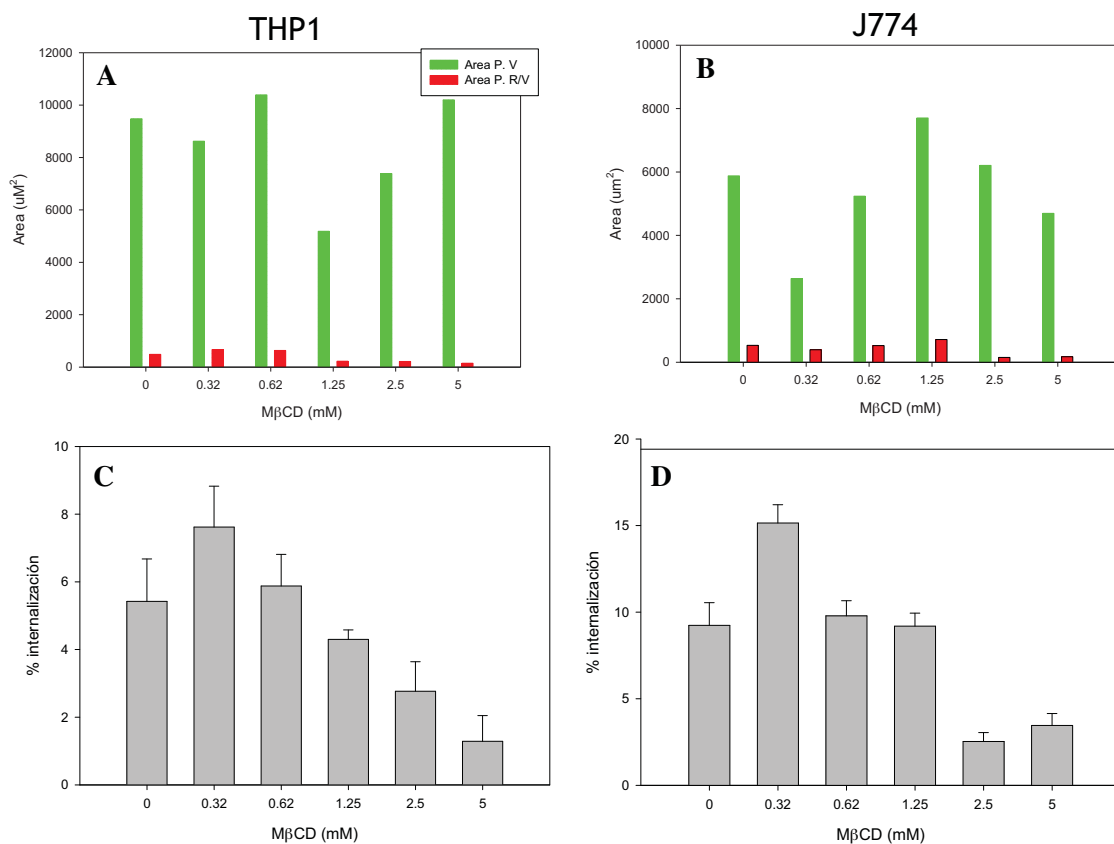


Fig. 25. Estimación del porcentaje de internalización de la proteína VP6 en macrófagos. Utilizando el programa *Cell Internalización Estimator* se calculó el área ocupada por los pixeles verdes (A y B, barras verdes) y el área de pixeles rojos que coinciden con los pixeles verdes (C y D, barras rojas) para una colección de imágenes obtenidas a partir de los ensayos de inhibición de entrada de los nanotubos de VP6 en macrófagos en presencia de diferentes concentraciones de MβCD. El porcentaje de internalización se definió como el % de área verde ocupada por los pixeles rojos respecto al área verde total, que representa el número total de células. Las barras de error muestran las diferencias entre dos o tres réplicas de imágenes por cada condición (concentración de inhibidor).

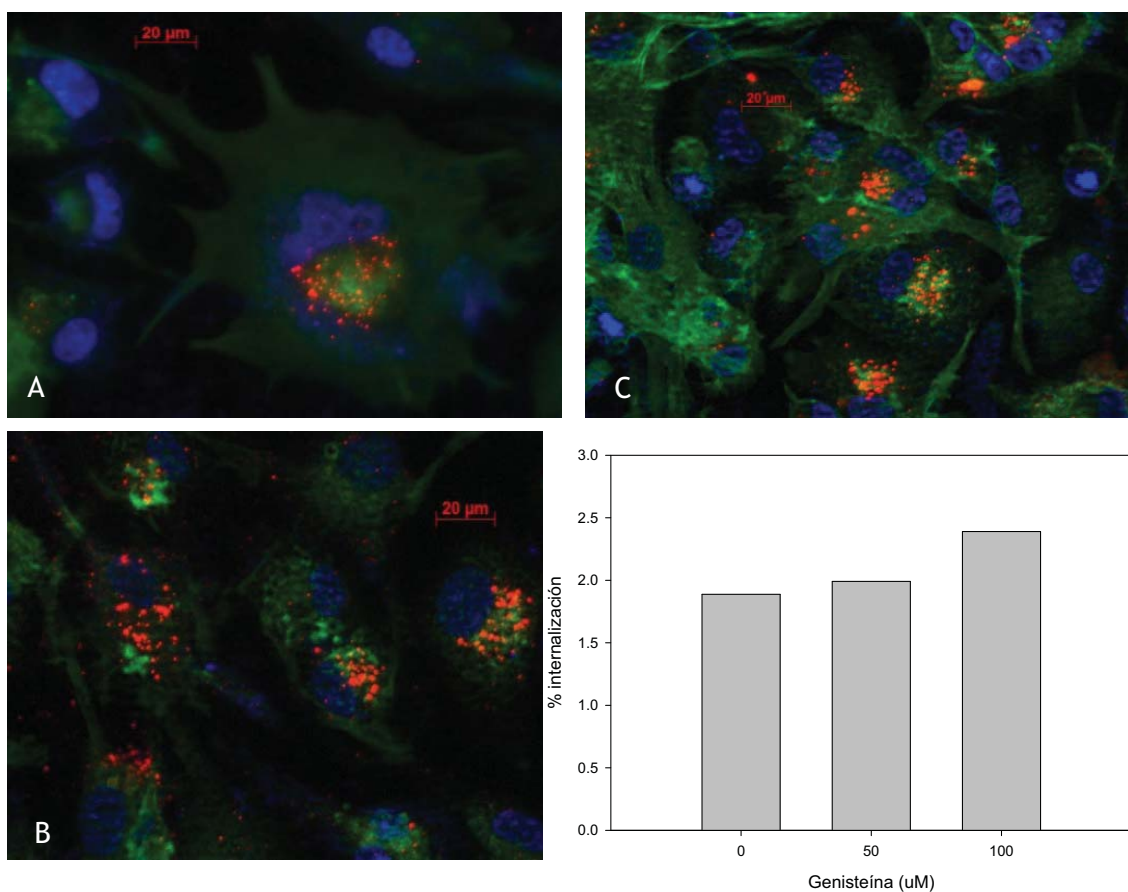


Fig. 26. Influencia de la genisteína sobre la internalización de los nanotubos de VP6 en células THP1. Las células se incubaron durante 2 h con diferentes concentraciones de genisteína (A:0, B:50 μM y C: 100 μM) y posteriormente se adicionaron los nanotubos de VP6 a una concentración de 150 μg/mL. La detección de VP6 se realizó con el AcM 255/60 y un suero policlonal anti-ratón Alexa 594 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-Alexa 488 (verde). En la gráfica se muestra el porcentaje de internalización de VP6 a diferentes concentraciones de genisteína.

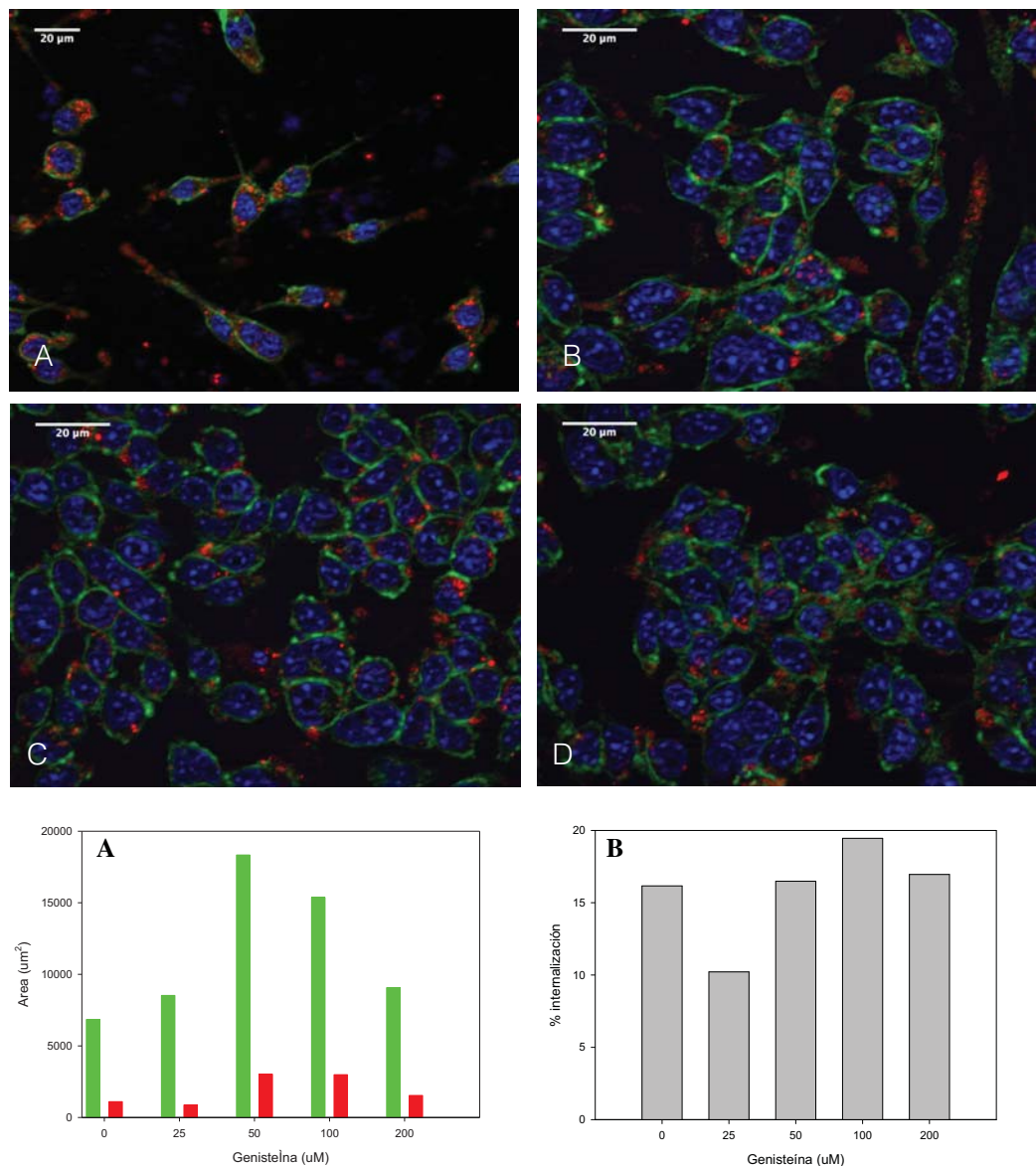


Fig. 27. Influencia de la genisteína sobre la internalización de los nanotubos de VP6 en células J774. Las células se incubaron durante 2 h con diferentes concentraciones de genisteína (A:0, B:50 μM, C: 100 μM y D: 200 μM) y posteriormente se adicionaron los nanotubos de VP6 a una concentración de 150 μg/mL. La detección de VP6 se realizó con el AcM 255/60 y un suero policlonal anti-ratón Alexa 594 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-Alexa 488 (verde). En la gráfica se muestra el % de internalización de VP6 a diferentes concentraciones del inhibidor.

5.7 Ensayos para encapsular ADN en el interior de los nanotubos de VP6

Como parte de nuestro proyecto deseábamos explorar la utilización de los nanotubos de VP6 como acarreadores de biomoléculas, entre ellas, de ADN. En nuestro grupo se han logrado desensamblar los nanotubos de VP6 mediante la adición de calcio al medio, y la proteína VP6 monomérica se ha vuelto a reensamblar en tubos utilizando el agente quelante EGTA, el cual secuestra el Ca^{2+} de la solución (Mena, 2007). En nuestro caso desensamblamos los nanotubos de VP6 mediante la adición de CaCl_2 y el reensamblaje de los tubos se realizó mediante diafiltración en presencia de ADN a diferentes pHs. Posteriormente evaluamos si el ácido nucleico se protegía de la degradación por nucleasas. En la Figura 28 se muestra el resultado de los geles de agarosa donde se visualizó el ADN plasmídico incubado con los nanotubos de VP6 a diferentes pHs y tratado con benzonasa. En los carriles 1 y 2 se muestra el plásmido pVAX1-EGFP utilizado como control positivo antes y después de ser tratado con la nucleasa, respectivamente. En los carriles 4 y 5 se observa el ADN incubado con VP6 antes y después de ser tratado con la nucleasa. En la figura se ve que a ninguno de los pHs analizados (5, 7 y 8) se logró proteger el ADN de la degradación enzimática, no obstante, a pH 8 (gel A) se observó un retardo en la migración del ADN al interactuar con los nanotubos de VP6 (carril 4) comparado con la migración del plásmido sin nanotubos (carril 2), lo cual indica que puede existir interacción entre el plásmido y los nanotubos de VP6 a este valor de pH. La cantidad de ADN plasmídico visualizada en los geles corresponde aproximadamente a 200 ng en cada carril.

Las muestras de ADN y VP6 reensamblada también se tiñeron con acetato de uranilo para visualizarlas en el MET y determinar si efectivamente se formaron nanotubos de VP6 a los pHs analizados en presencia de plásmido. Para el caso de las muestras reensambladas a pHs 5 y 7, no se observaron nanotubos de VP6 (Figura 29, A y B), en cambio sólo se visualizaron agregados de ácido nucleico a pH5 y casi ninguna nanoestructura a pH7. Los nanotubos de VP6 sólo fueron visualizados en las muestras reensambladas a pH8 (Figura 29 C y D). En este caso, se muestra además el ADN interactuando con los nanotubos de VP6 por su cara externa. Teniendo en cuenta estos resultados decidimos explorar nuevas estrategias para reensamblar los nanotubos de VP6 y encapsular el ADN en su interior. Una de ellas fue evaluar otras soluciones tampón.

Materiales y Métodos

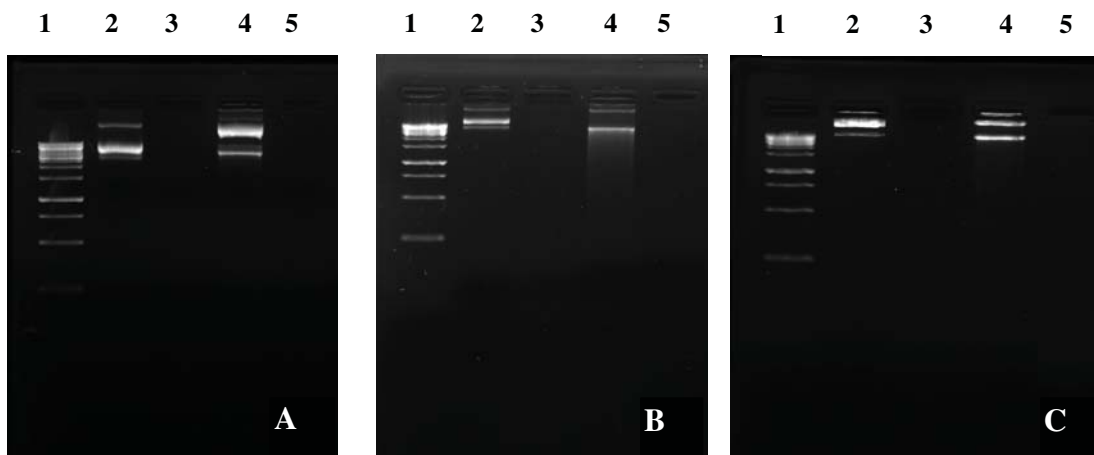


Fig. 28. Geles de agarosa para la visualización de ADN plasmídico utilizado en el reensamblaje de los nanotubos de VP6 a pH 8 (A), pH 7 (B) y pH 5(C). 1- PPM Gene Ladder 1Kb. 2-Plásmido solo. 3- Plásmido + Benzonasa. 4- Plásmido en presencia de VP6. 5- Plásmido en presencia de VP6 + Benzonasa.

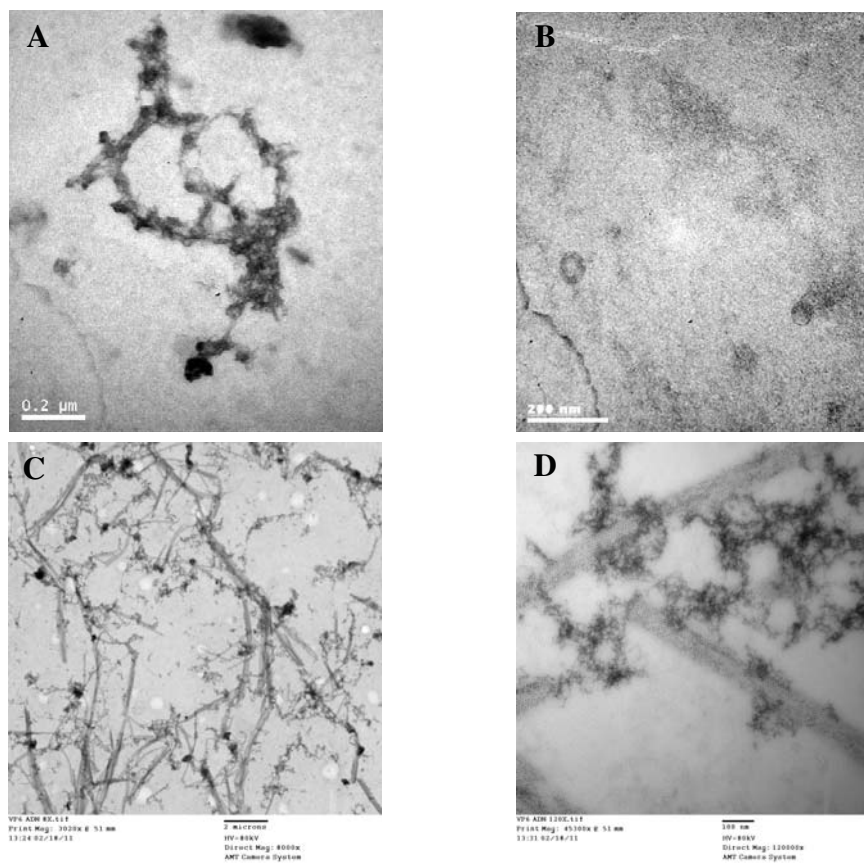


Fig 29. Micrografías de muestras después del reensamblaje de VP6 en presencia de ADN plasmídico a pH 5 (A, 50 K), 7 (B) y 8 (C, 8K; D, 120K). Las muestras se visualizaron mediante tinción negativa con acetato de uranilo utilizando MET.

Walter y colaboradores (1999) reportaron que en presencia de un buffer de 100 mM NaHCO₃ aumentó la eficiencia de encapsulación del ADN plasmídico en el interior de micropartículas del polímero PGLA y además se incrementó la resistencia del ADN al estrés mecánico producido por la ultrasonicación. Tomando en cuenta este reporte decidimos realizar el reensamblaje de los nanotubos de VP6 en presencia de ADN plasmídico utilizando una solución tampón de NaHCO₃. En la figura 30A se muestra el plásmido pVAX1-EGFP en sus diferentes grados de superenrollamiento (carril 2) o luego de la adición de benzonasa (carril 3), donde se aprecia que no queda ADN luego del tratamiento con la enzima (ensayo control positivo). Como vemos en los carriles 4 y 5, el ADN plasmídico tampoco se protegió de la degradación por Benzonasa cuando se adicionó a la reacción de reensamblaje de los nanotubos de VP6, visualizándose interactuando con los nanotubos de VP6 en su superficie externa (Figura 30, B). En el gel de agarosa se observa además una disminución considerable de todas las formas topológicas del plásmido cuando se incubó con la solución de reensamblaje junto con VP6 (carril 4), lo cual puede deberse a que la mayor parte del ADN precipitó junto con el Ca²⁺ cuando se adicionó la solución de NaHCO₃.

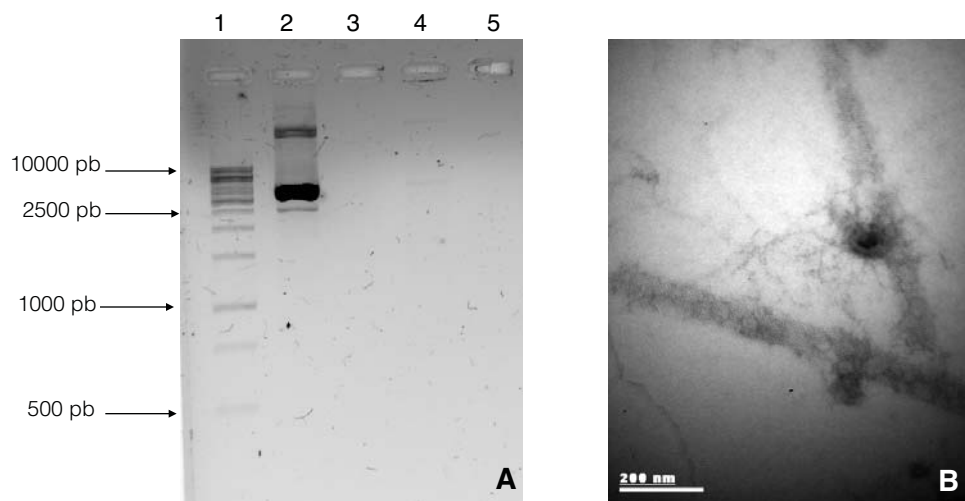


Fig. 30. ADN plasmídico en presencia de nanotubos de VP6 reensamblados en una solución de NaHCO₃ pH 8.3. A: Gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio: 1-PPM Gene Ladder 1kb. 2- Plásmido control solo. 3- Plásmido control + Benzonasa. 4- Plásmido en presencia de los nanotubos de VP6. 5- Plásmido en presencia de los nanotubos de VP6 + Benzonasa. B: MET de la mezcla VP6-ADN teñida con acetato de uranilo a un aumento de 85 000X.

5.8 Reensamblaje de nanotubos de VP6 con NaHCO_3

Como parte de estos ensayos de reensamblaje de nanotubos de VP6 en presencia del buffer de NaHCO_3 , notamos que la calidad de los tubos reensamblados fue alta teniendo en cuenta la limpieza de las muestras y la reproducibilidad de este protocolo. De esta forma decidimos probar la eficiencia de este protocolo de reensamblaje en la recuperación de proteína VP6 mal ensamblada obtenida en un proceso de purificación. En la figura 31A se muestra una imagen de MET de la proteína purificada mal ensamblada, donde se observan agregados y hexámeros de VP6 dispersos. Luego del reensamblaje de VP6 con bicarbonato, se observan tubos bien formados, que presentan el arreglo característico de los hexámeros de VP6, con longitudes incluso mayores a los $2 \mu\text{m}$ y sin restos de proteína sin ensamblar. Estos tubos reensamblados mantuvieron su estructura incluso 6 meses después de obtenidos (Figura 31, B).

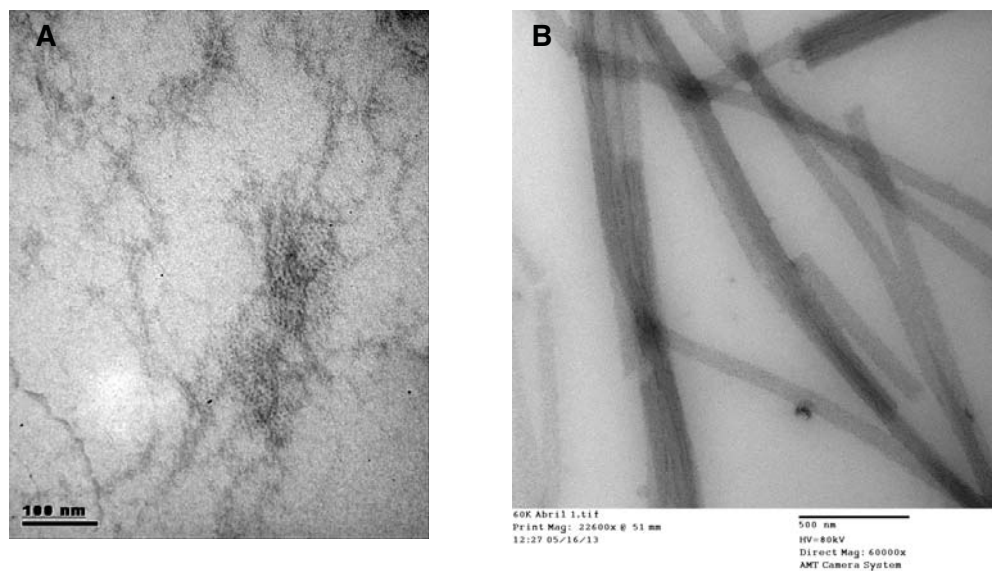


Fig. 31. Tinción negativa de VP6 y visualización mediante MET. Se muestra la proteína VP6 purificada a partir de sobrenadante de células de insecto utilizando un aumento de 20 K (A) y los nanotubos de VP6 reensamblados con 100 mM de NaHCO_3 se observan a una magnificación de de 60 K (B).

Materiales y Métodos

Este ensayo nos ha permitido recuperar proteína que, al no encontrarse correctamente ensamblada, era usualmente desechada. Además, este método de reensamblaje de nanotubos de VP6 ha sido utilizado con éxito por Castro-Acosta et al. (2014) para evaluar la resistencia de la proteína VP6 a la oxidación utilizando peróxido de hidrógeno y Fe. En estos ensayos se logró la formación de nanotubos de VP6 incluso a concentraciones de 1000 μM de peróxido de hidrógeno.

6. Discusión

En este trabajo nos propusimos estudiar la capacidad de los nanotubos formados por la proteína VP6 de rotavirus de interaccionar con células de mamífero y de encapsular ADN como un primer paso en el desarrollo de un nuevo sistema de entrega de material genético. Nuestros resultados mostraron la baja toxicidad de los nanotubos de VP6 al ser adicionados a diferentes líneas celulares de mamífero, lo cual es un requisito indispensable que debe cumplir cualquier sistema acarreador de material genético. Nuestros resultados concuerdan con reportes previos donde se estudió el efecto de la adición de diferentes polímeros sobre la viabilidad de líneas celulares de mamífero en cultivo *in vitro* (Chen et al., 2005; Ten et al., 2014). Otras estructuras tubulares como los nanotubos de sílica han sido utilizados con éxito para la entrega de material genético (Chen et al., 2005), sin embargo existen numerosos reportes que muestran la toxicidad de polímeros tubulares como las fibras de proteínas β -amiloides (Harrison et al., 2007; Kagan et al., 2012).

Touzé et al (1998) estudió la capacidad de PPVs formadas por la proteína VP1 del virus de papiloma para acarrear ADN plasmídico, evaluando la internalización de las mismas en diferentes líneas celulares de origen animal y humano, como fueron las líneas humanas MRC5 (pulmón), HeLa (cervix), HuH-7 (hígado) y CaCo2 (colon), así como NIH 3T3 (embrión murino), Vero (riñón de mono), COS-7 (riñón de mono), MDCK (riñón de perro) y CHO (ovario de Hámster Chino). Las células COS-7 también han sido utilizadas por Chen et al (2005) en el estudio de la internalización de nanotubos de sílica como acarreadores de ADN. Estos resultados muestran la amplia gama de líneas celulares tanto humanas como animales que han sido objeto de estudio para evaluar la efectividad de los sistemas de entrega de material genético. En nuestro caso, evaluamos las células CaCo-2 por ser las que usualmente se utilizan para replicar rotavirus y porque se ha sugerido que la proteína VP6 puede interactuar con la Hsc70 presente en la membrana de estas células (Gualtero et al, 2007). Las células HEK-293 y COS-7 son comúnmente estudiadas en ensayos de internalización de nanopartículas (Vercauteren et al., 2010; Liu et al., 2014; Layek et al., 2014) , y teniendo en cuenta el tamaño de los nanotubos de VP6, nos interesó evaluar su entrada en líneas celulares de macrófagos, por lo que evaluamos las células

Discusión

THP1 y J774, las cuales han sido previamente utilizadas para estudiar el proceso fagocítico (Palmbos et al., 2002; Geng et al., 2007; Nagao et al., 2010; Morisighe et al., 2010).

Luego de corroborar la baja toxicidad de los nanotubos de VP6, realizamos ensayos de incubación de los mismos con diferentes líneas celulares de mamífero para determinar en cuál de ellas los nanotubos eran endocitados. De las líneas celulares de mamífero estudiadas, la internalización de los nanotubos de VP6 sólo ocurrió de manera específica en las líneas celulares de macrófagos THP1 y J774. En el resto de las líneas celulares analizadas (HEK-293, COS-7 y CaCo-2) la señal proveniente de la inmunodetección de VP6 se localizó fuera de las células. Una de las características distintivas de los macrófagos es su capacidad para fagocitar moléculas de gran tamaño e incluso células, por lo que para determinar si el tamaño de los nanotubos de VP6 es un factor que modula su especificidad de entrada a los macrófagos, realizamos ensayos de internalización presentando a la proteína VP6 como parte de estructuras de menor tamaño. Para ello los nanotubos se desnaturalizaron en presencia de SDS y calor y también utilizamos partículas pseudovirales de doble capa de rotavirus formadas por las proteínas VP2-GFP y VP6, las cuales se ensamblan formando esferas de 75 nm de diámetro. En ambos casos no se observó internalización de la proteína VP6 en los macrófagos a los tiempos y concentraciones analizadas. Un resultado similar fue reportado por Fifis y colaboradores (2004) donde estudiaron la internalización *in vivo* de nano y microesferas conjugadas a OVA analizando un rango de diámetros desde 40 nm a 2 μ m y observaron que las esferas mayores de 1 μ m fueron internalizadas preferentemente en los nódulos linfáticos de ratones por una población de células presentadoras de antígeno con fenotipo de macrófagos F4/80+ CD80+. Siendo los macrófagos importantes moduladores de la respuesta inmune, nuestros resultados ayudan a explicar desde el punto de vista celular porqué la respuesta de anticuerpos IgG anti-VP6 así como la protección frente a la infección por rotavirus es mayor en ratones inmunizados con los nanotubos de VP6 que en ratones inmunizados con partículas de doble capa (GFP-VP2/VP6) o con trímeros de VP6 (Pastor et al., 2014). No obstante, aunque los macrófagos representan una parte relevante del sistema inmune innato, existen otras poblaciones de células presentadoras de antígeno que son muy importantes en el desarrollo de la respuesta inmune en mamíferos, como las células dendríticas y los linfocitos B. Descubiertas en 1974 por Steinman y Cohn, las células dendríticas constituyen

Discusión

sentinelas que vigilan los tejidos periféricos muestreando antígenos, y son capaces de secretar citocinas que modulan el tipo de respuesta inmune que se desencadena: Th1 ó Th2 (Walsh y Mills, 2013). La importancia de las células dendríticas en la modulación de la respuesta de linfocitos T se ha demostrado por ejemplo en ratones en los cuales se ha eliminado esta población celular (Phythian-Adams et al., 2010). Estos hallazgos nos llevan a proponer la realización de los ensayos de internalización de los nanotubos de VP6 en células dendríticas.

La distribución de la señal de VP6 en el interior de los macrófagos es diferente en células THP1 y J774. En estas últimas la señal en rojo se distribuye en el citoplasma celular mayormente hacia la periferia, sin embargo en las células THP1 la proteína VP6 internalizada se detectó en la región perinuclear. Una distribución similar se observó en el interior de macrófagos derivados de médula ósea que fueron incubados con ovalbúmina encapsulada en liposomas (Rao et al., 2003). En estas células se visualizó la red Trans-Golgi mediante el marcaje con C6NBD-ceramida y la localización de la señal proveniente de la internalización de los complejos OVA-liposomas se visualizó distribuida en el aparato de Golgi.

La especificidad de entrada de los nanotubos de VP6 en macrófagos sugiere además que en estas células existe algún receptor para VP6. Gualtero y colaboradores (2007) sugirieron que existe interacción entre la proteína Hsc70 presente en la membrana de células CaCo-2 y MA104 y la proteína VP6. Además de su actividad como chaperona, esta proteína juega un papel fundamental en la activación del sistema inmune. Triantafilou et al. (2002) determinaron que Hsc70 forma parte de un receptor multimérico que reconoce el lipopolisacárido bacteriano en células del sistema inmune innato. Además, Hsc70 se une a los Toll-like receptors TLR2/TLR4 y a CD14 en la membrana de las células presentadoras de antígeno, y esta interacción permite la endocitosis de antígenos extracelulares unidos a Hsc70 que posteriormente pueden entrar a la vía de presentación cruzada (Asea et al., 2000; 2002). Para determinar si Hsc70 interviene en la entrada de los nanotubos de VP6 a los macrófagos es necesario realizar ensayos de internalización en las células THP1 y J774 preincubadas con un anticuerpo anti-Hsc70.

Para nuestros ensayos de internalización, tanto las células THP1 como las J774 fueron previamente diferenciadas mediante la adición de PMA al sobrenadante de cultivo. La

adición de PMA provoca un aumento en la expresión de la integrina $\alpha V\beta 3$ en la superficie de las células THP1, lo que aumenta su adhesión a la matriz extracelular y puede desencadenar un aumento en la secreción de TNF- α , la cual es una citocina proinflamatoria que tiene un papel determinante en la maduración de la respuesta inmune frente a infecciones parasitarias, bacterianas y virales (Janeway et al., 1999; Kurihara et al., 2011).

El PMA es un análogo del diacilglicerol (DAG), el cual se genera durante la formación de la copa fagocítica mediante la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato. Entre otras funciones, el incremento de la concentración de DAG durante la fagocitosis estimula a la familia de las PKCs, cuyas variantes α , δ y ϵ son reclutadas a la membrana plasmática e incrementan la capacidad fagocítica de los macrófagos (Larsen et al., 2000). La activación de las PKCs promueve la reorganización del citoesqueleto de actina, necesaria para que se extiendan los pseudópodos de la membrana plasmática hacia el exterior de los fagocitos (Downey et al., 1992); además, las PKCs están asociadas con el incremento del estallido respiratorio en los macrófagos y con la activación de la fosfolipasa A2, la cual produce ácido araquidónico (Karimi et al., 1999). En los fagocitos, el estallido respiratorio es un proceso en el que se generan compuestos bactericidas como el anion superóxido y el peróxido de hidrógeno, los cuales se producen mediante la acción de la enzima NADPH oxidasa. Esta enzima es activada por el ácido araquidónico que se produce durante la fagocitosis, el cual interviene además en la formación de los ruffles membranales en el sitio de la fagocitosis. Los productos metabólicos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) intervienen también en el establecimiento de la respuesta inflamatoria (Lennartz, 1999). Los efectos de la adición de PMA sobre el mecanismo de fagocitosis en los macrófagos pueden explicar porqué los nanotubos de VP6 son internalizados en células J774 solamente cuando éstas son tratadas con PMA. En las células sin tratar, se observa la interacción de los nanotubos de VP6 sólo con la superficie celular, lo que sugiere que existe interacción con un receptor de membrana pero que ésta no es suficiente para la internalización de los nanotubos.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de entrada de los nanotubos de VP6 a los macrófagos, los ensayos de internalización se realizaron preincubando las células THP1 y J774 con dos inhibidores de la endocitosis: M β CD y genisteína. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que se utilizan para disolver compuestos grasos de baja solubilidad

Discusión

en agua y han sido utilizadas para secuestrar el colesterol de las membranas, limitando la formación de las balsas lipídicas, las cuales están compuestas por colesterol y esfingolípidos que concentran proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol y glicoesfingolípidos (Rao et al., 2003). La concentración de ciertos grupos de proteínas en balsas lipídicas ha demostrado ser determinante en la transducción de señales, por ejemplo en la activación de linfocitos T mediada por la unión al TCR (Montixi et al., 1998; Viola et al., 1999). Se ha propuesto además que como consecuencia de la extracción del colesterol de la membrana plasmática, se reduce el grado de invaginación de las vesículas endocíticas, por lo que algunos receptores (por ej, el receptor de transferrina) se acumulan en la membrana plasmática de las células (Subtil et al., 1999). La inhibición de la entrada de los nanotubos de VP6 tanto a las células THP1 como a J774 sugiere que la presencia de colesterol en la membrana plasmática de los macrófagos y probablemente la asociación de ciertos receptores en balsas lipídicas se requieren para la endocitosis de los tubos. En concordancia con nuestros resultados, Nagao y colaboradores (2010) reportaron que la adición de M β CD inhibe la entrada de micropartículas de poliestireno de 3 μ m de diámetro a células J774, sugiriendo que el proceso de internalización se lleva a cabo por fagocitosis dependiente de receptores localizados en balsas lipídicas. La importancia de la presencia de colesterol en la membrana plasmática de las células J774 también fue demostrada por Gatfield y Peters (2000). Estos autores reportaron que la adición de M β CD disminuyó la fagocitosis de *Mycobacterium bovis* BCG en un 90%. La adición de M β CD a células THP1 previamente activadas con PMA también inhibió la internalización de lactoferrina humana mediante un mecanismo endocítico dependiente de clatrina que involucra el reconocimiento de receptores localizados en la membrana de los macrófagos (Florian et al., 2012).

La genisteína es un inhibidor de Tyr-cinasas y cuando se añade a células en cultivo inhibe varios procesos endocíticos como la endocitosis dependiente de clatrina y caveolina y la fagocitosis mediada por receptores Fc y Receptores Scavenger. La genisteína también inhibe el reclutamiento de la dinamina II al sitio de endocitosis, por lo que impide la escisión de las vesículas endocíticas (Strzelecka-Kiliszek et al., 2004; Swanson and Hoppe, 2004; Pelkmans et al., 2005; Sulahian et al., 2008, Vercauteren et al., 2010).

Discusión

Uno de los eventos de señalización más descritos en células derivadas de médula ósea luego de la unión ligando-receptor es la activación de las proteín-cinasas, las cuales se activan rápidamente mediante la fosforilación de residuos de tirosina (Campbell et al., 1999; Van Leeuwen et al., 1999; Mero et al., 2006). Generalmente la familia de las cinasas Src constituyen los primeros blancos de activación y fosforilan a las cinasas Syk, lo que conlleva al desarrollo de cascadas de fosforilación y activación de enzimas citosólicas incluyendo la fosfolipasa C y proteínas adaptadoras que eventualmente activan la transcripción de genes específicos en las células (Ghazizadeh et al., 1994; Greenberg et al., 1996; Crowley et al., 1997; Vermes et al., 2000). Nuestros resultados mostraron que la adición de genisteína a células THP1 y J774 no inhibió la internalización de los nanotubos de VP6, lo que nos lleva a sugerir que el proceso de entrada de los nanotubos en macrófagos es independiente de la actividad de las Tyr-cinasas. Un resultado similar al nuestro fue reportado por Mero et al. (2006) en ensayos donde estudiaron el efecto de la adición de genisteína en la fagocitosis de perlas de poliestireno opsonizadas con IgG a través del receptor FcγII. Estos autores reportaron que la adición de genisteína no inhibió la fosforilación del receptor por cinasas de la familia de las Src ni tampoco se afectó la fagocitosis en la línea celular de hámster chino ts20. Teniendo en cuenta estos reportes de la literatura y a partir de nuestros ensayos de internalización, podemos sugerir que la entrada de los nanotubos de VP6 se lleva a cabo mediante un proceso de fagocitosis, puesto que sólo ocurrió en las líneas celulares de macrófagos, y que la entrada de los tubos depende del reconocimiento de un receptor asociado a balsas lipídicas presente en la membrana de los macrófagos.

El objetivo de nuestro trabajo fue utilizar a los nanotubos de VP6 como un sistema de encapsulación y entrega de material genético. Una vez que observamos que los nanotubos de VP6 fueron internalizados en macrófagos, encaminamos nuestros esfuerzos a la encapsulación de ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6. Para ello los nanotubos purificados se desensamblaron mediante la adición de CaCl₂ y los monómeros de VP6 se incubaron con ADN plasmídico en presencia de diferentes soluciones tampón para eliminar el Ca²⁺ de la solución y reensamblar a la proteína VP6 en presencia de ADN.

Discusión

En ninguna de las condiciones analizadas el ADN plasmídico se protegió de la degradación con nucleasas y solamente cuando el reensamblaje se realizó en presencia de Tris-HCl 10 mM pH 8 o en presencia de 100 mM de NaHCO₃ pH 8.3 se obtuvieron nanotubos como resultado del reensamblaje de VP6 en presencia de ADN plasmídico. En ambos casos las imágenes obtenidas mediante MET muestran al ADN interactuando con la cara externa de los nanotubos de VP6. Teniendo en cuenta que el método que escogimos para evaluar la protección del ácido nucleico fue la adición de la enzima benzonasa, es necesario realizar los experimentos de digestión con la enzima inmovilizada en una matriz para asegurarnos de que parte de la enzima no haya sido capaz de difundir al interior de los nanotubos de VP6 y degradar ADN plasmídico encapsulado en el interior de los mismos.

Hasta el momento los métodos reportados para reensamblar los nanotubos de VP6 consisten en eliminar el Ca²⁺ de la solución mediante diálisis durante varios días (Ready y Sabara, 1987; Lepault et al., 2001). En este trabajo desarrollamos un método de reensamblaje de los nanotubos de VP6 que consistió en eliminar el Ca²⁺ de la solución mediante precipitación con NaHCO₃, el cual permitió la obtención de nanotubos en pocas horas. Los nanotubos de VP6 generados utilizando esta técnica presentaron longitudes mayores a los 3 µm y su estabilidad en el tiempo respecto a los nanotubos reensamblados por diálisis fue mayor (Rodríguez et al, en preparación). La capacidad de entrada a macrófagos de los nanotubos de VP6 reensamblados con bicarbonato de sodio debe ser evaluada, debido a que éstos presentan un tamaño promedio mayor que los tubos purificados a partir de la infección de células de insecto.

En general, los sistemas de encapsulación de ADN que se han utilizado hasta el momento, ya sean lípidos o polímeros catiónicos, PPVs o polímeros sintéticos, tienen en común la presencia de cargas positivas que permiten la interacción con los ácidos nucleicos (Singh et al., 2005; Al Dosari y Gao, 2009; Cadena-Nava et al., 2012; Teunissen et al., 2013). Por ejemplo, los lipoplexes se forman a partir de la mezcla entre liposomas catiónicos y el ADN, donde las cargas positivas de los liposomas se unen a los grupos fosfato del ácido nucleico. Estos complejos tienen diámetros que oscilan entre los 200 nm y los 2 µm (Wasan et al., 1996). El modelo propuesto para la interacción entre los liposomas catiónicos y el ADN es que los primeros compactan al ácido nucleico y neutralizan su carga.

Discusión

Seguidamente esta neutralización de las cargas puede inducir la agregación que resulta en la formación de estructuras multilamelares heterogéneas en las cuales las bicapas de lípidos atrapan al ADN como en un sandwich (Radler et al., 1997). Además de la compactación del ADN en los lipoplexes, éste puede protegerse de la degradación por nucleasas intra y extracelulares (Eastman et al., 1997). Los polímeros catiónicos por otra parte no poseen motivos hidrofóbicos, sin embargo pueden condensar el ADN de manera más eficiente que los liposomas catiónicos, lo que resulta en partículas de menor tamaño que pueden ser incluso de 20 ó 40 nm de diámetro. La polietilenimina, uno de los polímeros catiónicos más utilizados para encapsular ADN, facilita además el escape de los endosomas a través de su efecto esponja de protones (Khalil et al., 2006).

El plásmido pVAX1 utilizado en nuestro trabajo tiene una longitud de 3761 pares de bases, que equivale a 1217 nm. Si estuviera en su conformación relajada, o sea, completamente circular, tendría un diámetro de 387 nm, lo cual supera en casi 8 veces el diámetro interno de los nanotubos de VP6, el cual es aproximadamente de 50 nm. Estos datos nos sugieren que una de las razones por las cuales no logramos encapsular ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6 puede ser la insuficiencia de cargas positivas en la luz de los nanotubos que permitan la compactación y encapsulación del ADN.

El estudio del empaquetamiento del genoma de los virus en sus respectivas cápsides ha permitido esclarecer el tipo de interacciones que se establecen entre las proteínas virales y los ácidos nucleicos. En general, los virus de ADN de doble cadena como los bacteriófagos o los adenovirus requieren la aplicación de una fuerza sobre el ácido nucleico para confinar al mismo en la cápside viral, puesto que el ADN de doble cadena es una molécula difícil de comprimir debido a su rigidez y alto grado de auto-repulsión. En los fagos existen proteínas motoras para el empaquetamiento del ADN en el interior de la cápside viral que ejercen más fuerza que las helicasas más eficientes. Los motores de los fagos ϕ 29 y T4 generan fuerzas que exceden los 60 pN, de 10 a 20 veces mayor que la fuerza generada por la miosina y la kinesina (Knobler y Gelbart, 2009). De forma contraria, los virus de ARN de simple o doble cadena empaquetan su ácido nucleico espontáneamente. Una manera de contrarrestar el efecto de auto-repulsión presente en el ADN es el uso de poliaminas, las cuales neutralizan las cargas negativas de los grupos fosfato. Como alternativa en nuestros ensayos de encapsulación del ADN en los nanotubos de VP6, podemos utilizar un agente

Discusión

que condense el ADN y que interactúe con los grupos fosfato como la espermina, la cual ha sido utilizada en otros sistemas de entrega de material genético (Ronsin et al., 2001; Mintzer y Simanek, 2009). Alternativamente se puede realizar una sustitución de algunos aminoácidos del loop α B- β C de VP6 por argininas y evaluar si el aumento de cargas positivas en la luz de los nanotubos se traduce en una mayor capacidad de unión y compactación del ácido nucleico. De lograrse la encapsulación de ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6, contaríamos con un vehículo de entrega de ADN específico para macrófagos que constituiría un excelente candidato vacunal.

Este trabajo constituye el primer reporte sobre la interacción de los nanotubos de VP6 con células de mamífero y contribuye a entender la alta inmunogenicidad de esta estructura proteica, la cual ha sido previamente reportada (Blazevic et al., 2011). La proteína VP6 en forma de nanotubos ha mostrado ser biocompatible con células de mamífero en cultivo y su capacidad de interactuar con macrófagos puede ser explotada para utilizarla como acarreador de moléculas a células del sistema inmune, lo cual podría resultar en una terapia contra diversos padecimientos como artritis reumatoide y diabetes autoinmune (Barrera et al., 2000; Wu et al., 2000). A partir de nuestros resultados podemos sugerir que la entrada de los nanotubos de VP6 en macrófagos ocurre a través de un proceso de fagocitosis que involucra la unión a un receptor de membrana asociado a las balsas lipídicas y que no depende de la actividad de las Tyr-cinasas. Para corroborar que la entrada de los nanotubos de VP6 a macrófagos es un proceso fagocítico podemos utilizar un inhibidor de la polimerización del citoesqueleto de actina como la citocalasina D. Si bien hasta el momento no se ha podido encapsular ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6, otros ácidos nucleicos como los oligonucleótidos o siARNs pueden ser evaluados.

7. Conclusiones

1. Los nanotubos de VP6 no son citotóxicos al ser administrados a las líneas celulares de mamífero HEK-293, COS-7, CaCo-2, THP1 y J774 a concentraciones que oscilan entre los 150 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De estas líneas celulares, los nanotubos de VP6 se internalizaron solamente en los macrófagos, y este proceso está relacionado a las dimensiones de los nanotubos, ya que la proteína VP6 en forma monomérica o formando parte de PPVs de doble capa GFP-VP2/VP6 no fue internalizada por los macrófagos.

2. La internalización de los nanotubos de VP6 en las células THP1 y J774 depende de la presencia de colesterol en la membrana plasmática, lo que sugiere que existe una interacción con un receptor en la membrana de los macrófagos que está asociado a las balsas lipídicas. Además, la entrada de los nanotubos no se inhibió con la adición de genisteína, sugiriendo que este proceso es independiente de la actividad de las Tyr-cinasas. Estos resultados nos permiten sugerir que la entrada de los nanotubos de VP6 a los macrófagos ocurrió mediante fagocitosis.

3. Hasta el momento no se logró encapsular ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6 mediante desensamblaje y reensamblaje *in vitro*, probablemente debido a la insuficiencia de cargas positivas dentro de los nanotubos que no sean capaces de compactar al plásmido de forma que entre al lumen de los nanotubos.

Conclusión general del trabajo: *Hasta el momento no hemos sido capaces de encapsular ADN plasmídico en el interior de los nanotubos de VP6, pero teniendo en cuenta que éstos fueron internalizados en macrófagos, no se descarta su uso como agentes acarreadores de otro tipo de material genético específico para células del sistema inmune.*

8. Perspectivas

1. Realizar los ensayos de internalización de los nanotubos de VP6 en las líneas de macrófagos THP1 y J774 en presencia de citocalasina D para corroborar si la entrada de los nanotubos de VP6 depende de la polimerización del citoesqueleto de actina.
2. Para identificar si la proteína Hsc70 está involucrada en la entrada de los nanotubos de VP6 a los macrófagos, realizar los ensayos de internalización de los nanotubos de VP6 en macrófagos adicionando un anticuerpo anti-Hsc70.
3. Evaluar la internalización de los nanotubos de VP6 en células dendríticas.
4. Evaluar si otros ácidos nucleicos como los oligonucleótidos, ADN de doble cadena lineal o ARN pueden ser encapsulados en el interior de los nanotubos de VP6.
5. Sustituir algunos aminoácidos del loop α B- β C de VP6 por aminoácidos básicos con el objetivo de incrementar el número de cargas positivas orientadas hacia la luz de los nanotubos de VP6 y evaluar la posibilidad de encapsular ADN plasmídico.

9. Referencias Bibliográficas

- Affranchino JL, González SA. (1997) Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6. *J Gen Virol.* 78 (Pt 8):1949-55.
- Al-Dosari M, Gao X. (2009) Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J.* 2009 December; 11(4): 671–681.
- Allen LA and Aderem A. (1996) Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 8:36 – 40.
- Arcaro A and Wymann MP. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutro- phil responses. *Biochem J* 296 (Pt 2): 297–301.
- Andre F, Mir LM. (2004) DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther.* 11:S33–42.
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, et al. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 6:435-42.
- Asea A, Rehli M, Kablingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 277:15028-34.
- Aiuti A, Bacchetta R, Seger R, Villa A, Cavazzana-Calvo M. (2012) Gene therapy for primary immunodeficiencies: part 2. *Curr Opin Immunol.* 24(5):585-591.
- Bally MB, Harvie P, Wong FM, Kong S, Wasan EK, and Reimer DL (1999) Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 38:291–315.
- Barrera, P., van Lent, P. L. E. M., van Bloois, L., van Rooijen, N., Malefijit, M. C. D., van de Putte, L. B. A., Storm, G., and van den Berg, W. B. (2000) Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumat.* 43: 1951–1959.
- Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T. (2011) Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine* 29 (45):8126-8133.
- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. (1996) Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*, 272(5258):104-7.
- Cadena-Nava RD, Comas-Garcia M, Garmann RF, Rao AL, Knobler CM, Gelbart WM. (2012) Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J Virol.* 86(6):3318-26.
- Campbell KS. (1999) Signal transduction from the B cell antigen- receptor. *Curr Opin Immunol.* 11:256-64
- Carreño-Fuentes L, Ascencio JA, Medina A, Aguila S, Palomares LA, Ramírez OT. (2013) Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires. *Nanotechnology.* 24(23):235602.
- Castro-Acosta RM, Rodríguez-Limas WA, Valderrama B, Ramírez OT, Palomares LA. (2014) Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microb Cell Fact.* 13(1):25.
- Champion JA, Walker A, Mitragotri S. (2008) Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res.* 25(8):1815-21.

Bibliografía

- Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J. (2002) Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol*, 76:7822-31.
- Charpilienne A, Nejmeddine M, Berois M, Parez N, Neumann E, Hewat E, Trugnan G, Cohen J. (2001) Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J Biol Chem*. 276(31):29361-7.
- Chasey D, Labram J.(1983) Electron microscopy of tubular assemblies associated with naturally occurring bovine rotavirus. *J Gen Virol*. 64 (Pt 4):863-72.
- Chen C-C, Liu Y-C, Wu C-H, Yeh C-C, Su M-T, Wu Y-C. (2005) Preparation of Fluorescent Silica Nanotubes and Their Application in Gene Delivery. *Adv Mat*. 17 :404 – 407.
- Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature (Lond)* 422:37–44.
- Corrigan-Curay J, Cohen-Haguenaer O, O'Reilly M, et al. (2012) Challenges in vector and trial design using retroviral vectors for long-term gene correction in hematopoietic stem cell gene therapy. *Mol Ther*. 20(6):1084-1094.
- Corthesy B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H, Schwartz-Cornil I (2006) Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intra- cellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80(21):10692–10699.
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J Exp Med*. 186:1027-39.
- Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotten M. (1991) Adenovirus enhancement of transferrin–polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:8850–4.
- Dennehy PH. (2008) Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol*. 21:198-208.
- Díaz-Moscoso A, Vercauteren D, Rejman J, Benito JM, Ortiz Mellet C, De Smedt SC, Fernández JM. (2010) Insights in cellular uptake mechanisms of pDNA-polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (CDplexes). *J Control Release*. 143(3):318-25.
- Diprose, J. M., J. N. Burroughs, G. C. Sutton, A. Goldsmith, P. Gouet, R. Malby, I. Overton, S. Zientara, P. P. Mertens, D. I. Stuart, and J. M. Grimes. (2001) Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core. *EMBO J*. 20:7229–7239.
- Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S. (1992) Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. *J Cell Biol*. 116(3):695-706.
- Eastman SJ, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH, and Scheule RK (1997) Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1325:41–62.
- Erk I, Huet JC, Duarte M, Duquerroy S, Rey F, Cohen J, Lepault J. (2003) A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus. *J Virol*. 77:3595-601.
- Estes MK. (1997) Rotaviruses and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Field's Virology*. 4ta edición. Filadelfia: Lippincott-Raven: 1625-1655.
- Fairn GD, Grinstein S (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends in Immunology*. 33(8):397-405.

Bibliografía

- Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Prasad BV, Greenberg HB. (2002) Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest*, 109(9): 1203-13.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M. (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 173(5):3148-54.
- Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. (1974) Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol*. 27(8):608-14.
- Florian P, Macovei A, Sima L, Nichita N, Mattsby-Baltzer I, Roseanu A. (2012) Endocytosis and trafficking of human lactoferrin in macrophage-like human THP-1 cells. *Biochem Cell Biol*. 90(3): 449-55.
- Galy A, Thrasher AJ. Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. (2011) *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 11(6):545-550.
- Gatfield J, Pieters J. (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 288:1647-50.
- Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE. (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol*. 2(4):249-55.
- George M, Abraham TE. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release*. 114(1):1-14.
- Gerdes C. A, Castro, M. G, Lowenstein P. R. (2000) Strong promoters are the key to highly efficient, noninflammatory and noncytotoxic adenoviral-mediated transgene delivery into the brain in vivo. *Mol. Ther*. 2, 330–338.
- Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO. (2010) Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol*. 91(Pt 6):1428-38.
- Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem*. 269:8878-84.
- Ghosh D, Chakraborty P. (2002) Involvement of protein tyrosine kinases and phosphatases in uptake and intracellular replication of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes in mouse macrophage cells. *Biosci Rep*. 22(3-4):395-406.
- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. (2013) Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med*. 15(2):65-77.
- Glass R, Parashar U, Patel M, Gentsch J, Jiang B. (2013) Rotavirus vaccines: successes and challenges. *J Infect*. 68 Suppl 1:S9-18.
- Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. (1996) Clustered Syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:1103-7.
- Gualtero DF, Guzman F, Acosta O, Guerrero CA (2007) Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein HSC70-mediated rotavirus infection. *Arch Virol*. 152 (12):2183-2196.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immuno- deficiency. *N Engl J Med*. 348: 255–256.

Bibliografía

- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302: 415–419.
- Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, and Howard CJ (2002) Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol*. 23:158–164.
- Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP (2007) Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 159:1–77.
- Hattori Y, Kawakami S, Nakamura K, Yamashita F, Hashida M. (2006) Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. *J Pharmacol Exp Ther*. 318(2):828-34.
- Hewlett LJ, Prescott AR, and Watts C (1994) The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol*. 124:689–703.
- Hillebrenner H, Buyukserin F, Stewart JD, Martin CR. (2006) Template synthesized nanotubes for biomedical delivery applications. *Nanomed*. 1:39-50.
- Itoh K, Watanabe A, Funami K, Seya T, Matsumoto M. (2008) The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production. *J Immunol*. 181(8):5522-9.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Capra JD. (1999) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, NY: Elsevier Science Ltd./Garland Publishing. p 292, 598-608.
- Jariyapong P, Chotwiwatthanakun C, Somrit M, Jitrapakdee S, Xing L, Cheng HR, Weerachatanukul W. (2014) Encapsulation and delivery of plasmid DNA by virus-like nanoparticles engineered from *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus. *Virus Res*. 179:140-6.
- Jayaram H, Estes MK, Prasad BV (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 101:67–81.
- Jensen KD, Kopecková P, Bridge JH, Kopecek J. (2001) The cytoplasmic escape and nuclear accumulation of endocytosed and microinjected HPMA copolymers and a basic kinetic study in Hep G2 cells. *AAPS PharmSci*. 3(4):E32.
- Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R (2012) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol Pharm* 9(4):708–717.
- Kaplan IM, Wadia JS, and Dowdy SF (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*. 102:247–253.
- Karimi K, Gemmill TR, Lennartz MR. (1999) Protein kinase C and a calcium-independent phospholipase are required for IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells. *J Leukoc Biol*. 65(6):854-62.
- Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. (2006) High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem*. 281(6):3544-51.
- Kimchi-Sarfaty C, Ben-Nun-Shaul O, Rund D, Oppenheim A, Gottesman MM. (2002) In vitro packaged SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther*. 13(2): 299-310.
- Kimura T, Murakami T. (1977) Tubular structures associated with acute nonbacterial gastroenteritis in young children. *Infect Immun*. 17(1):157-60.
- Kjeken R, Mousavi SA, Brech A, Griffiths G, Berg T. (2001) Wortmannin-sensitive trafficking steps in the endocytic pathway in rat liver endothelial cells. *Biochem J*. 15;357(Pt 2):497-503.

Bibliografía

- Kloeckner J, Prasmickaite L, Hogset A, Berg K, Wagner E. (2004) Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J Drug Target.* 12:205–13.
- Knobler CM, Gelbart WM. (2009) Physical chemistry of DNA viruses. *Annu Rev Phys Chem.* 60:367-83.
- Kopatz I, Remy JS, and Behr JP (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med.* 6:769–776.
- Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Chairol O, Airiau M, Scherman D, Crouzet J, Pitard B. (1999) Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucl Ac Res.* 27:3792-3798.
- Kumar SR, Ahmed V.P.I, Parameswaran V, Sudhakaran R, Babu VS, Hameed S. (2008) Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *angullarum*. *Fish & Shellf Immun.* 25:47-56.
- Kurihara Y, Nakahara T, Furue M. (2011) $\alpha V\beta 3$ -integrin expression through ERK activation mediates cell attachment and is necessary for production of tumor necrosis factor alpha in monocytic THP-1 cells stimulated by phorbol myristate acetate. *Cell Immunol.* 270(1):25-31.
- Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, and Anderson RG (1983) Depletion of intra- cellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33:273–285.
- Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR. (2000). Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol.* 165(5):2809-17.
- Lawton JA, Estes MK, Prasad VV. (1997) Three dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Struct Biol.* 4:118-121.
- Layek B, Haldar MK, Sharma G, Lipp L, Mallik S, Singh J. (2014) Hexanoic Acid and Polyethylene Glycol Double Grafted Amphiphilic Chitosan for Enhanced Gene Delivery: Influence of Hydrophobic and Hydrophilic Substitution Degree. *Mol Pharm.* Feb 19.
- Lennartz MR. (1999) Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol.* (3-4):415-30.
- Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA. (2001) Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J.* 20:1498-507.
- Li W, Nicol F, Szoka FC Jr. (2004) GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(7):967-85.
- Liu F, Qi H, Huang L, Liu D. (1997) Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther.* 4:517–23.
- Liu Y, You R, Liu G, Li X, Sheng W, Yang J, Li M. (2014) *Antheraea pernyi* Silk Fibroin-Coated PEI/DNA Complexes for Targeted Gene Delivery in HEK 293 and HCT 116 Cells. *Int J Mol Sci.* 15(5):7049-63.
- Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. (2002) Phase 1/2 placebo-controlled, double- blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 105: 2012–8.

Bibliografía

- Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourot B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, Mehtali M. (1998) In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2022-32.
- Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA. (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20:1485-97.
- Matsui H, Johnson LG, Randell SH, and Boucher RC (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 272:1117–1126.
- Maxfield FR and McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:121–132.
- Mayor S, Pagano RE. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(8):603-12.
- McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Ward RL (2002) CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). *J Virol.* 76(2): 560–568.
- Meier O and Greber UF (2003) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 5:451–462.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol.* 122:443-52.
- Mena JA. (2007) Desarrollo de estrategias racionales de producción de partículas pseudovirales en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Doctorado, IBT, UNAM.
- Mero P, Zhang CY, Huang ZY, Kim MK, Schreiber AD, Grinstein S, Booth JW. (2006) Phosphorylation-independent ubiquitylation and endocytosis of Fc gammaRIIA. *J Biol Chem.* 281(44):33242-9.
- Mintzer MA, Simanek EE. (2009) Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev.* 109(2):259-302.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM et al. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17: 5334–48.
- Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. (2010) The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1beta production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials.* 31(26):6833-42.
- Nagao G, Ishii K, Hirota K, Makino K, Terada H. (2010) Role of lipid rafts in phagocytic uptake of polystyrene latex microspheres by macrophages. *Anticancer Res.* 30(8):3167-76.
- OMS: Weekly epidemiological record NO. 32, 10 AUGUST 2007.
- Pal SN, Kofidis T. (2013) Therapeutic potential of genes in cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 11(8):1015-28.
- Palmboos PL, Sytsma MJ, DeHeer DH, Bonnema JD. (2002) Macrophage exposure to particulate titanium induces phosphorylation of the protein tyrosine kinase lyn and the phospholipases Cgamma-1 and Cgamma-2. *J Orthop Res.* 20(3):483-9.

Bibliografía

- Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K, Bianco A. (2004) Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43(39):5242-6.
- Parton RG, Joggerst B, and Simons K (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 127:1199–1215.
- Pastor-Flores AR Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel-Soto E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA. (2013) The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine.* 2014 Feb 25. pii: S0264-410X(14)00191-1.
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E (2004). Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr. Pharm.* 10: 3769–77.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, and Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 3:473–483.
- Pelkmans L. (2005) Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biophys Acta.* 1746(3):295-304.
- Phythian-Adams AT, Cook PC, Lundie RJ, Jones LH, Smith KA, Barr TA, Hochweller K, Anderton SM, Hämmerling GJ, Maizels RM, MacDonald AS. (2010) CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J Exp Med.* 207(10):2089-96.
- Plascencia-Villa G, Mena JA, Castro-Acosta RM, Fabian JC, Ramirez OT, Palomares LA (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromatogr B.* 879 (15-16):1105-1111.
- Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT. (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng.* 104(5):871-81.
- Radler JO, Koltover I, Salditt T, and Safinya CR. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science (Wash DC).* 275:810–814.
- Rao M, Peachman KK, Alving CR, Rothwell SW. (2003) Depletion of cellular cholesterol interferes with intracellular trafficking of liposome-encapsulated ovalbumin. *Immunol Cell Biol.* 81:415- 23.
- Ready KF, Sabara M. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology.* 157(1):189-98.
- Rejman J, Bragonzi A, and Conese M (2005) Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther.* 12:468– 474.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10(4):961-74.
- Rojas Gómez R. (2009) Estudio de la capacidad de unión y transporte de cápsides de virus adenoasociado tipo 2 en células de mamífero. Tesis de Maestría, IBT, UNAM.
- Ronsin G, Perrin C, Guédat P, Kremer A, Camilleri P, Kirby AJ. (2001) Novel spermine-based cationic gemini surfactants for gene delivery. *Chem Commun (Camb).* (21):2234-5.

Bibliografía

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 9 (7):676-682.
- Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J (2002) Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *J Virol*. 76(16):8110–8117.
- Segura MM, Alba R, Bosch A, Chillón M. (2008) Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther*. 8(4):222-35.
- Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD, Briand JP, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. (2005) Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J Am Chem Soc*. 127(12):4388-96.
- Sonawane ND, Szoka FC Jr, Verkman AS. (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine–DNA polyplexes. *J Biol Chem*. 278:44826–31.
- Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. (2000) Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther*. 7:481–92.
- Steinman RM, Cohn ZA. (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 139(2):380-97.
- Strzelecka-Kiliszek A, Korzeniowski M, Kwiatkowska K, Mrozinska K, Sobota A. (2004) Activated FcγRII and signalling molecules revealed in rafts by ultra-structural observations of plasma-membrane sheets. *Mol Membr Biol*. 21:101–108.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(12):6775-80.
- Suh J, Wirtz D, Hanes J. (2003) Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7):3878-82.
- Sulahian TH, Imrich A, Deloid G, Winkler AR, Kobzik L. (2008) Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respir Res*. 9:59.
- Swanson JA and Watts C (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*. 5:424–428.
- Swanson JA, Hoppe AD. (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Biol*. 76(6):1093-103.
- Takei K and Haucke V (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*. 11:385–391.
- Ten E, Ling C, Wang Y, Srivastava A, Dempere LA, Vermerris W. (2014) Lignin nanotubes as vehicles for gene delivery into human cells. *Biomacromolecules*. 15(1):327-38.
- Teunissen EA, de Raad M, Mastrobattista E. (2013) Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *J Control Release*. 172(1):305-21.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 4(5):346-58.
- Touzé A, Bousarghin L, Ster C, Combata AL, Roingeard P, Coursaget P. (2001) Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J Gen Virol*. 82:3005-3009.

Bibliografía

- Touzé A, Coursaget P. (1998) In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucl Ac Res.* 26:1317-1323.
- Triantafilou M, Triantafilou K. (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23(6):301-4.
- Van Leeuwen JE, Sanielson LE. (1999) T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol.* 11:242-8.
- Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K (2010) The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther.* 18 (3):561-569.
- Vermes C, Roebuck KA, Chandrasekaran R, Dobai JG, Jacobs JJ, Glant TT. (2000) Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor κ B which down-regulates type 1 collagen synthesis in human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 15:1756-65.
- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* 283:680–2.
- Wadia JS, Stan RV, and Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 10:310 –315.
- Walter E, Moelling K, Pavlovic J, Merkle HP. (1999) Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *J Control Release.* 61(3):361-74.
- Walsh KP, Mills KH. (2013) Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* 34(11):521-30.
- Watkins CL, Brennan P, Fegan C, Takayama K, Nakase I, Futaki S, Jones AT. (2009) Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J Control Release.* 140(3):237-44.
- Ward RL, McNeal MM (2010) VP6: a candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 202(Suppl):S101–S107.
- Wasan EK, Reimer DL, and Bally MB (1996) Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. *J Pharm Sci.* 85:427–433.
- Willett K, Bennett J. (2013) Immunology of AAV-Mediated Gene Transfer in the Eye. *Front Immunol.* 4:261.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465–8.
- Wu, G. S., Korsgren, O., Zhang, J. G., Song, Z. S., van Rooijen, N., and Tibell, A. (2000) Pig islet xenograft rejection is markedly delayed in macrophage-depleted mice: a study in streptozotocin diabetic animals. *Xenotransplantation.* 7: 214 –220.
- Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, Przybylska M, et al. (2000) Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther.* 1:255–62.
- Yin W, Xiang P, Li Q. (2005) Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal Biochem.* 346:289-294.
- Zhao Q, Chen W, Chen Y, Zhang L, Zhang J, Zhang Z. (2011) Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconj Chem.* 22(3):346-52.

10. Productos generados

10.1 Artículos arbitrados

1. **Rodríguez M**, Wood C, Sanchez-López R, Castro-Acosta RM, Ramírez OT, Palomares LA. Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Arch Virol. En prensa.*

2. Alida Ospina-Orejarena; Ricardo Vera-Graziano; Maria M Castillo-Ortega; Juan P Hinestroza; **Mabel Rodríguez-Gonzalez**; Laura A Palomares-Aguilera. Collagen-functionalized polylactic acid nanofibers via grafting of anhydride groups: Synthesis, characterization and in-vitro assessment of their cell culture properties. *Journal of Applied Polymer Science. Sometido.*

Corresponding Author: Alfredo Maciel.

3. **Mabel Rodríguez**, Ricardo M Castro, Octavio T. Ramírez and Laura A. Palomares. Re-assembly of rotavirus VP6 nanotubes using a novel approach. *En preparación.*

10.2 Participación en congresos nacionales e internacionales

1. 2013 “IN VITRO ASSEMBLY OF PROTEIN NANOTUBES USING A NOVEL TECHNIQUE”. Mabel Rodríguez, Ricardo Castro Acosta, Octavio T. Ramirez and Laura A. Palomares. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Cancún, México.

2. 2011 “ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS FORMADOS POR LA PROTEÍNA VP6 DE ROTAVIRUS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO”. Mabel Rodríguez, Christopher Wood, Rosana Sánchez-López, Octavio T. Ramírez y Laura A. Palomares. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, México. Cartel Ganador.

3. 2010 “ASSESSING THE SUITABILITY OF ROTAVIRUS VP6 NANOTUBES AS VEHICLES FOR DELIVERY INTO CELLS”. Mabel Rodríguez, Christopher Wood, Rosana Sánchez-López, Octavio T. Ramírez and Laura A. Palomares. Cellular Delivery of therapeutic macromolecules, Gales, UK.

4. 2009 “ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS NANOTUBOS FORMADOS POR LA PROTEÍNA VP6 DE ROTAVIRUS EN CULTIVO CELULAR”. Mabel Rodríguez, Laura A. Palomares y Octavio T. Ramírez. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, México.

Anexo I

Descripción del programa “Cell Internalization Estimator”

Cell Internalization estimator, versión 1.0

Arturo Pimentel, LNMA, UNAM.

26 de Febrero de 2014

1. Introducción.

En este trabajo se describen las características técnicas de la herramienta *Cell Internalization estimator*, aplicación diseñada para cuantificar de forma supervisada el traslape espacial entre píxeles asociados a la fluorescencia de tres distintos fluoroforos.

Entre sus características principales se encuentran:

- ↔ Programación basada en Java, lo que permite portabilidad y librerías auto contenidas.
- ↔ Pre-procesamiento de la información a partir de archivos fuente (zvi, oib, etc).
- ↔ Herramientas de deconvolución iterativa para eliminar efectos de distorsión por difracción (PSF).
- ↔ Manejo simultáneo de canales independientes de fluorescencia.
- ↔ Segmentación manual basada en tres umbrales independientes de las regiones activas en cada canal.
- ↔ Cuantificación de traslape relativo entre marcajes.

Enseguida describiremos en detalle cada una de ellas.

2. Pre-procesamiento de la información.

En esta parte se ordena y prepara la información para las etapas de cuantificación. De inicio se pide al usuario que defina la carpeta donde se guardan los experimentos, el programa lee y registra el número de experimentos usando la librería provista por Linkert *et al* conocida como *Bioformats* [1]. Identifica la meta-data en cada colección y construye los arreglos de imágenes para procesar ¹. En el caso de estudio que discutiremos a lo largo de este reporte, el formato utilizado para registrar los datos experimentales es **ZVI**, formato privativo de los microscopios Zeiss. Como primer paso, el programa toma cada uno de los archivos **ZVI** e identifica los canales de fluorescencia asociados, que en este caso para cada experimento consiste en 4 canales:

Canal 0	⇒	Núcleos (Azúl)
Canal 1	⇒	Actina (Verde)
Canal 2	⇒	Proteína VP6 (Roja)
Canal 3	⇒	Campo claro

Cada uno de los canales resultantes es una imagen con 8-bit de profundidad.

¹Incluir las librerías de Bioformats en el programa permite que se pueda utilizar cualquier clase de archivo compatible con esta librería (openmicroscopy.org/site/support/bio-formats5/).

3. Herramientas de deconvolución iterativa.

En el siguiente paso en el proceso el programa pide al usuario decidir si aplica o no un proceso de deconvolución iterativo sobre las imágenes obtenidas en el paso de pre-procesamiento. Este proceso resulta de mucha utilidad para restaurar imágenes donde la distorsión por difracción es importante. La utilidad que realiza este proceso se consigue integrando a la plataforma las librerías del plugin desarrollado por Brooks y Humphreys en el 2005 de nombre *Iterative Deconvolution 3D* [2]. Para su uso se requiere especificar una función de dispersión puntual (PSF) en formato de una imagen y nuestro programa permite al usuario decidir sobre que canales será aplicado este proceso de deconvolución.

4. Segmentación simultánea de canales independientes de fluorescencia.

Por construcción, dentro de la colección de experimentos, uno de ellos debe estar etiquetado como **control positivo**. Las condiciones experimentales de este experimento establecen que, hipotéticamente, contiene las imágenes con mayor intensidad de fluorescencia dentro de la colección. Nuestro programa busca la etiqueta que denote este experimento y muestra al usuario cada uno de los tres canales de fluorescencia asociados. Para ello utiliza una interfaz gráfica que incluye utilerías que permiten definir, mediante un procedimiento manual de segmentación simple por umbral, los valores máximo y mínimo (gL_{2c} y gL_{1c} respectivamente) de intensidad de la fluorescencia que marca las regiones de interés para cada canal de fluorescencia, tratando de evitar fondo y artefactos. Posterior a este proceso de segmentación el algoritmo regresa a toda la colección y determina, imagen por imagen y canal por canal de fluorescencia, que píxeles se encuentran dentro del rango delimitado por gL_{2c} y gL_{1c} . Los píxeles resultantes se registran en arreglos que conservan la información del experimento y canal al que corresponde cada píxel.

5. Cuantificación de traslape relativo entre marcajes.

Basándose en la información obtenida en la etapa de segmentación, el proceso de cuantificación define para cada uno de los experimentos que píxeles de cada canal de fluorescencia aparecen dentro del umbral definido por el usuario a través de los niveles gL_{2c} y gL_{1c} . Una vez obtenidos los conjuntos de píxeles para cada canal, se determinan las coincidencias espaciales entre los píxeles de cada uno de los tres conjuntos y se registra el número de coincidencias. a partir del número de coincidencias es posible calcular el número de traslapes relativo entre los tres canales, información a partir de la cual es posible darle interpretación biológica a los resultados experimentales.

Referencias

- [1] **Linkert, M., Rueden, C.T. et al.** (2010). «Metadata matters: access to image data in the real world». En *The Journal of Cell Biology*, 189 (5):777–782. doi:10.1083/jcb.201004104. URL <http://jcb.rupress.org/content/189/5/777.abstract>.
- [2] **Brooks, T.F. y Humphreys, W.** (2005). «Three-dimensional application of DAMAS methodology for aeroacoustic noise source definition». En *AIAA paper*, 2960:2005.

Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine

Mabel Rodríguez · Christopher Wood ·
Rosana Sanchez-López · Ricardo M. Castro-Acosta ·
Octavio T. Ramírez · Laura A. Palomares

Received: 10 May 2013 / Accepted: 30 October 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract Rotavirus VP6 nanotubes are an attractive option for a recombinant vaccine against rotavirus disease. Protection against rotavirus infection and an adjuvant effect have been observed upon immunization with VP6 nanotubes. However, little information exists on how VP6 nanotubes interact with cells and trigger an immune response. In this work, the interaction between VP6 nanotubes and different cell lines was characterized. VP6 nanotubes were not cytotoxic to any of the animal or human cell lines tested. Uptake of nanotubes into cells was cell-line-dependent, as only THP1 and J774 macrophage cells internalized them. Moreover, the size and spatial arrangement of VP6 assembled into nanotubes allowed their uptake by macrophages, as double-layered rotavirus-like particles also displaying VP6 in their surface were not taken up. The internalization of VP6 nanotubes was inhibited by methyl- β -cyclodextrin, but not by genistein, indicating that nanotube entry is specific, depends on the presence of cholesterol in the plasma membrane, and does

not require the activity of tyrosine kinases. The information generated here expands our understanding of the interaction of protein nanotubes with cells, which is useful for the application of VP6 nanotubes as a vaccine.

Introduction

Rotavirus causes severe diarrhea in young children and is responsible for about 40 percent of hospitalizations of children under the age of five [1]. Efficient live vaccines against rotavirus are now on the market [2]. However, there is still a need for recombinant vaccines that are safer and faster to produce and develop [3]. An excellent alternative for such a recombinant vaccine is rotavirus VP6, which has been shown to induce a strong immune response and provide protection against rotavirus infection [4–6]. VP6 forms the intermediate layer of the rotavirus capsid, assembling over the nucleocapsid formed by VP2. Even when VP6 does not induce neutralizing antibodies, it has been shown that mice immunized with VP6 are protected against rotavirus infection, as measured by a decrease in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-013-1916-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Rodríguez · R. M. Castro-Acosta · O. T. Ramírez ·
L. A. Palomares (✉)
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto
de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca, MOR, Mexico
e-mail: laura@ibt.unam.mx

M. Rodríguez
e-mail: mabel@ibt.unam.mx

R. M. Castro-Acosta
e-mail: rcastro@ibt.unam.mx

O. T. Ramírez
e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

C. Wood
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología
Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca,
MOR, Mexico
e-mail: chris@ibt.unam.mx

R. Sanchez-López
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca, MOR, Mexico
e-mail: rosana@ibt.unam.mx

rotavirus shedding [7, 8]. Protection is conferred by transcytosis of immunoglobulins through epithelial cells, where they inhibit viral replication. VP6 also induces a strong CD4⁺ T-cell response that reduces viral shedding by the secretion of immune-modulating cytokines such as IFN- γ and IL-17 [9, 10].

When only VP6 is recombinantly expressed, it assembles into nanotubes, spheres or trimers, depending on the pH and ionic strength. VP6 nanotubes of several micrometers in length and 75 nm or 45 nm in diameter are obtained at pH values between 5.5 and 7 and above pH 7, respectively. Additionally, icosahedral particles are observed under acidic pH (3.5–5.5) conditions [11, 12]. Recently, it was observed that VP6 nanotubes have an adjuvant effect when they are coadministered to mice with norovirus-like particles, increasing the neutralizing antibody response against noroviruses [13]. Moreover, immunization of mice with VP6 nanotubes elicits an antibody response that correlates with protection against challenge with rotavirus and confers a higher degree of protection than immunization with double-layered rotavirus particles (dIRLP; containing VP2) or VP6 trimers [14].

The potential of protein nanotubes to induce strong immune responses has been demonstrated by others. Ghosh et al. [15] obtained strong humoral responses towards peptides when they were displayed in the nonstructural NS1 protein of bluetongue virus, which assembles into nanotubes. However, no information exists about the properties of protein nanotubes that make them better immunogens than other assemblies. Tubular structures have unique characteristics that can determine their immunogenicity. The distance between epitopes is different than in spherical particles [16], and they have a high aspect ratio. It has been shown that epitope density affects IgG responses. When administered to mice, tubular structures have longer circulation times than spherical particles [17].

The aim of this study is to understand the interaction of VP6 nanotubes with cells *in vitro* in order to obtain information that explains their high immunogenicity and adjuvant effect. The study is focused on macrophages, which are immune modulator cells [18]. It was shown that VP6 nanotubes selectively enter macrophages. In contrast, double-layered spherical particles or denatured VP6 did not enter macrophages. Nanotube internalization was inhibited by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) but not by genistein, indicating that a high cholesterol concentration in the cell membrane is needed and that entry does not require the activity of tyrosine kinases. This work contributes to our understanding of the mechanisms involved in the high efficiency of VP6 nanotubes as a potential vaccine.

Materials and methods

Production and purification of VP6 nanotubes and dIRLP

VP6 nanotubes and dIRLP were produced in an insect cell-baculovirus expression vector system using High Five[®] cells cultured in shake flasks (500 mL). For the production of nanotubes, cultures at a cell concentration of 0.5×10^6 cells/mL were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 plaque forming units (pfu)/cell with a recombinant baculovirus (bacVP6) that contains the gene of rotavirus VP6 (strain SA11) under the *polh* promoter (kindly provided by Dr. S. López, UNAM). Cultures were harvested 96 h later and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Culture supernatants were concentrated three times using a stirred ultrafiltration cell (Amicon, Millipore, USA) with a cellulose membrane with 30 kDa molecular weight cutoff (Millipore, USA). The purification process consisted of anion exchange and gel permeation chromatography in an AKTA Prime chromatography system (GE Healthcare, USA) as described previously [19]. The presence and purity of VP6 were confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The average size of nanotubes was determined by dynamic light scattering using a Zeta Sizer Nano (Malvern Instruments, USA) and by electron microscopy. VP6 nanotubes were deposited on a 200-mesh Formvar carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA), stained with 1 % uranyl acetate, and observed in an EM900 Zeiss transmission electron microscope (TEM) operated at 80 kV. Spherical dIRLP composed of VP2 and VP6 rotavirus proteins were produced using a similar protocol. In this case, culture flasks were coinfecting with recombinant baculoviruses containing the genes of the rotavirus proteins VP6 and the fusion protein GFPVP2 (RF, bacGFPVP2, kindly donated by Professor Cohen, INRA, France), at an MOI of 1 pfu/cell [20]. Purified VP6 nanotubes and dIRLP were quantified using a Bradford protein assay (Bio-Rad).

Cell culture

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA). The monocyte cell line THP1 and the macrophage cell line J774 were cultured in Advanced RPMI Reduced Serum Medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10 % (v/v) FBS, 2 mM glutamine (Sigma) and 0.05 mM β -mercaptoethanol (Sigma). In order to differentiate THP1 cells from monocytes to macrophages, 50 ng/mL of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem, Merck) was added to the cells 96 h before

performing the cytotoxicity and internalization experiments. In the case of J774 cells, the same amount of PMA was added to cells for 48 h to increase their phagocytic capacity. Cells were cultured at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Viability and total cell concentrations were determined using a hemacytometer (Fullerton, CA, USA).

Cytotoxicity assays

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells were seeded in 96-well plates at a cell concentration of 10⁴ cells/well in DMEM supplemented with 10 % (v/v) FBS. The following day, the culture medium was removed and cells were washed with PBS. Fifty microliters of medium containing different concentrations of VP6 nanotubes was added to cells and incubated for 2 h. Viability was measured using an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) assay [21]. Briefly, 10 µL of an MTT stock solution diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (5 mg/mL) was added to each well. After incubation for two additional hours at 37 °C, the plates were centrifuged at 2000g for 10 min. The culture supernatant was removed, and 50 µL of DMSO was added to the cell pellets. Once the formazan crystals were dissolved, absorbance at 595 nm was measured in a plate spectrophotometer (ELx800, Bio-Tek Instruments Inc.). Cell viability was calculated by comparing the absorbance of untreated cells (100 % viability) with the absorbance of treated cells.

THP1 and J774 cells were seeded in 96-well plates at a cell concentration of 2 × 10⁴ cells/well in RPMI supplemented with 10 % (v/v) FBS and 50 ng/mL PMA. Ninety-six hours later for THP1 cells or 48 h later for J774 cells, the medium was removed and cells were washed twice with PBS. Different concentrations of VP6 nanotubes in RPMI were added to cells and incubated for 2 h at 37°C, and viability was measured as described previously. To evaluate the cytotoxicity of the endocytosis inhibitors MβCD (Sigma) and genistein (Sigma) to THP1 and J774 cells, a similar experiment was performed where the inhibitors, diluted in RPMI, were added to cells and incubated for 2 h.

In vitro uptake of VP6 nanotubes

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells were seeded at 5 × 10⁴ cells/well in 8-well chamber slides (Lab-Tek® II CC2TM Chamber Slide, Nunc) and cultured for 24 h in DMEM containing 10 % FBS (v/v). THP1 cells 10⁵ per well were seeded in 8-well chamber slides in RPMI containing 10 % FBS (v/v), and 50 ng/mL PMA was added to induce cell differentiation for 96 h.

Differentiation of J774 cells was induced by treatment with PMA for 48 h. Cells were washed twice with PBS, VP6 nanotubes resuspended in serum-free medium at a concentration of 150 µg/mL were added, and cells were incubated at 37 °C. As controls, uptake of denatured VP6 or dIRLP was also tested. VP6 was denatured by heating at 90 °C for 20 min in the presence of 0.5 % SDS and then diafiltered in RPMI culture medium. After 4 h, medium was removed and cells were washed twice with cold PBS, fixed with 4 % formaldehyde in PBS (v/v) for 20 min and permeabilized with 0.2 % sodium deoxycholate and 2 % bovine serum albumin (BSA) (m/v) in PBS. After washing with PBS, cells were incubated with the monoclonal antibody (MAb) 255/60, which is specific for a conformational epitope in VP6 trimers [22], followed by a secondary antibody, a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa Fluor 594 (Invitrogen). The actin cytoskeleton was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen), and the cell nuclei were stained with SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). To assess the uptake of dIRLP, no staining was used, as VP2 is fused to GFP and can be visualized directly due to its green fluorescence [23]. Samples were observed using a Zeiss Axio Observer microscope fitted with an ApoTome module for generation of optical slice images (Carl Zeiss, Jena, Germany) using 20× Plan-Neofluar and 40× Plan-Neofluar objectives. All images were captured using the same exposure time for each fluorophore. Image processing was performed using the Axio Vision Rel 4.8 software (Carl Zeiss). Alternatively, a confocal Olympus FV1000 microscope was used to visualize cells, and image processing was performed with the Fiji software [24].

Inhibition of VP6 nanotube uptake by the endocytosis inhibitors MβCD and genistein

THP1 and J774 cells were seeded in 8-well chamber slides and treated with PMA as described above. After washing with PBS, different concentrations of MβCD or genistein were added to cells, which were then incubated in serum-free RPMI at 37 °C. Two hours later, the medium was removed, the cells were washed twice with PBS, and 200 µL of VP6 nanotubes in serum-free RPMI at a concentration of 150 µg/mL was added to the wells. After 4 h at 37 °C, the medium was removed; cells were washed three times with cold PBS and treated for immunostaining with the anti-VP6 monoclonal antibody as described before. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen), and the cell nuclei were visualized with SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen).

Results

Production and characterization of VP6 nanotubes

VP6 nanotubes were purified as described previously [19]. SDS-PAGE, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) were used to determine the size and characteristics of purified nanotubes. Purified VP6 had purity greater than 95 % (gel not shown). TEM images showed that VP6 nanotubes had a diameter of 75 nm, with lengths ranging from 500 nm to 2 μm (Fig. 1). Analysis by DLS showed that 87.3 % of the nanotube population had an average hydrodynamic diameter of 1073 nm, corresponding to an equivalent sphere (Fig. 2, peak 1). Two smaller populations with hydrodynamic diameters above 80 nm were also observed (peaks 2 and 3). The diameter of the VP6 trimer is 8 nm (calculated based on the structure reported in ref. 15). Therefore, the smaller populations correspond to macromolecular assemblies of VP6, and not trimers or monomers. These results are in agreement with previous reports from our group [19, 25].

Evaluation of the cytotoxicity of VP6 nanotubes

To assess the cytotoxicity of nanotubes in a wide range of tissues, cell lines of different origin were used. CaCo-2 cells were derived from colon carcinoma, HEK-293 cells were obtained from human embryonic kidney, COS-7 cells were derived from the kidney of an African green monkey, J774 is a macrophage cell line established from a sarcoma that arose in a BALB/c mouse, and THP1 cells were derived from peripheral blood of a human male with monocytic leukemia (<http://www.atcc.org>). The *in vitro* toxicity of VP6 nanotubes was evaluated by incubating them with the various cell lines for 4 h at 37 °C. Viability remained above 80 % in all the cell lines tested, even at the highest nanotube concentration (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 3).

Therefore, VP6 nanotubes were not toxic to any of the cell lines tested here.

VP6 nanotubes are internalized only by macrophages

The internalization of VP6 nanotubes by the cell lines listed above was assessed using fluorescent immunolabeling and microscopy. VP6 nanotubes were observed attached to the exterior surface of CaCo-2 and HEK-293 cells, but not of COS-7 cells (Fig. 4, upper panels). However, no evidence of the intracellular presence of VP6 was observed when various z planes were examined, indicating that VP6 was not internalized by these cells. In contrast, when THP1 or J774 cells were incubated with VP6 nanotubes for 4 h, the intracellular presence of VP6 was immunodetected in both cell lines (Fig. 4D, F). No red fluorescence (anti-VP6 antibody) was observed in control cells incubated with medium without VP6 (Fig. 4E, G). VP6 was distributed in the cytoplasm of J774 cells mainly near the plasma membrane (Fig. 4F). In THP1 cells, VP6 was preferentially located in discrete spots in the perinuclear region. For comparison, THP1 and J774 cells were incubated with denatured VP6 (Fig. 5A, B) or with dIIRLP (Fig. 5C, D) for 4 h. dIIRLP are icosahedral, have a mean diameter of 70 nm, and are formed by GFP-VP2 and VP6. Denatured VP6 was only detected in the outer membrane of both macrophage cell lines. No intracellular VP6 or dIIRLP was detected, indicating that neither denatured VP6 nor dIIRLP was taken up by cells.

The internalization of VP6 nanotubes depends on the presence of cholesterol in the plasma membrane and is not influenced by the activity of tyrosine kinases

To investigate the entry route of VP6 nanotubes, two specific endocytosis inhibitors were used: M β CD and genistein. The concentration of both inhibitors was determined based on cytotoxicity studies and was set to

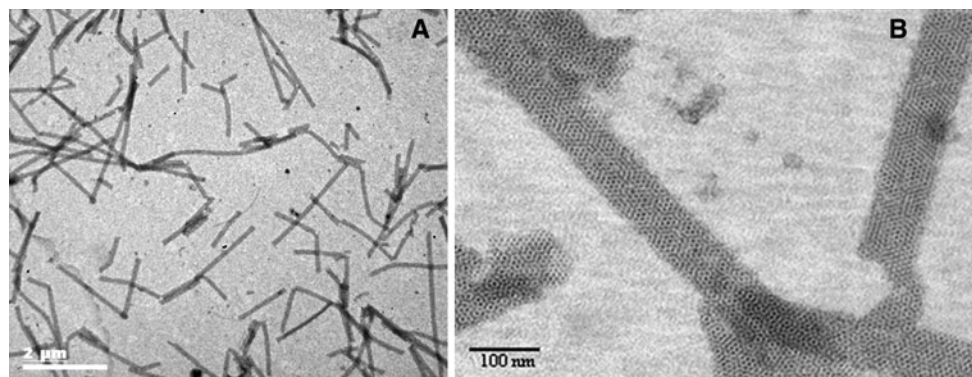


Fig. 1 Transmission electron microscopy of purified VP6 nanotubes. The sample was stained with uranyl acetate. A: Magnification of 7000 \times . B: Magnification of 100,000 \times . Scales are as indicated

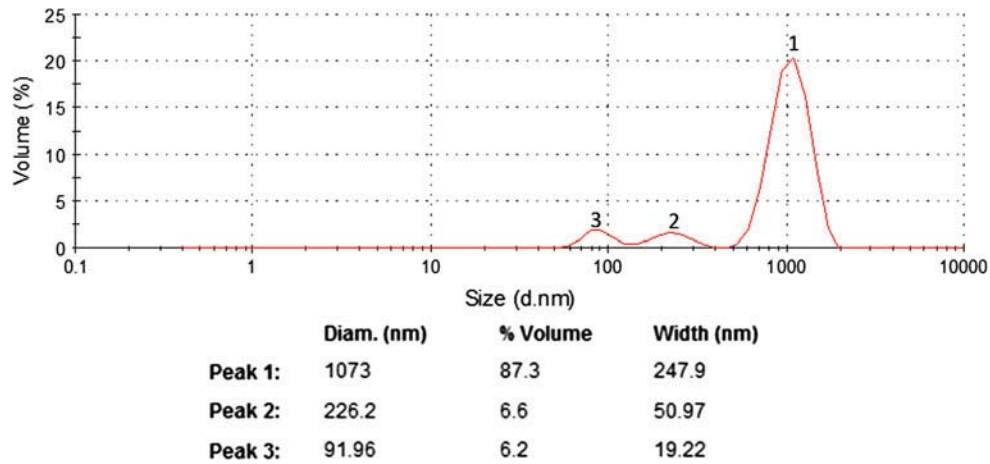


Fig. 2 Size distribution by volume of purified VP6 nanotubes as measured by dynamic light scattering. The graph shows the volume percent of each population versus their corresponding size in

nanometers, assuming a spherical particle shape. The table lists the average diameter of each population (nm)

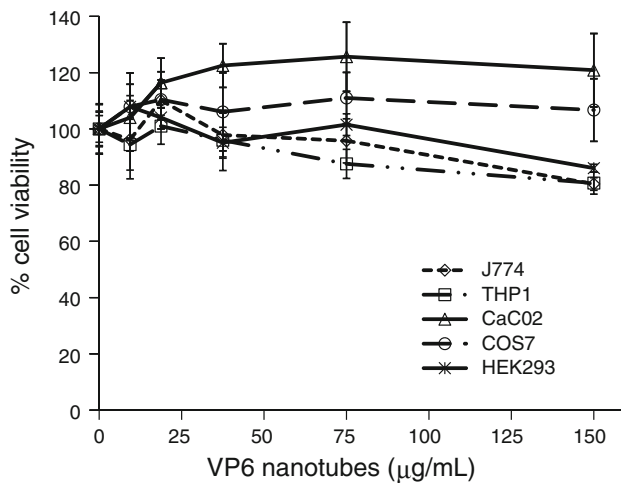


Fig. 3 Viability of CaCo-2, HEK-293, COS-7, THP1 and J774 cells incubated for 4 h with different concentrations of VP6 nanotubes diluted in serum-free medium. The percentage of cells that were viable was calculated with respect to the number of cells that were viable without treatment, defined as 100 %. Error bars indicate the standard deviation from eight replicate cultures

concentrations that did not affect the viability of THP1 or J774 cells. While no cytotoxicity was observed at the M β CD concentrations tested (0.3 to 5 mM), addition of genistein at concentrations above 200 μ M caused a significant decrease in viability of THP1 cells (data not shown). Therefore, M β CD concentrations between 0.3 and 5 mM and genistein at concentrations below 200 μ M were used for the endocytosis inhibition experiments in both cell lines.

M β CD reversibly extracts cholesterol from the plasma membrane [21]. THP1 cells were incubated for 2 h at 37 $^{\circ}$ C with a range of concentrations of M β CD (5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.312 mM) diluted in RPMI. VP6

nanotubes were then added to the cells and were incubated for an additional 4 h. VP6 was observed inside cells without M β CD, as well as in cells preincubated with 0.312 and 0.625 mM M β CD (Fig. 6A, B and C, respectively; Online Resource Fig. 1), whereas in cells treated with 1.25 mM to 5 mM M β CD, the VP6 signal detected inside THP1 cells decreased as the M β CD concentration increased. At the highest M β CD concentrations, VP6 was only observed outside the cells (Fig. 6E, F). Similar to this observation in THP1 cells, when J774 cells were preincubated with M β CD, the amount of VP6 inside the cells decreased as the concentration of M β CD increased (Fig. 7A to E). The addition of 5 mM M β CD to J774 cells almost completely abolished the red signal corresponding to VP6 (Fig. 7E). The green signal of the actin cytoskeleton co-localized with the red signal; therefore, the green signal of the phalloidin-Alexa 488 is shown in Online Resource Fig. 2.

When THP1 cells were incubated with 50 μ M and 100 μ M genistein (Fig. 8B and C), no reduction of the internalization of VP6 nanotubes was observed when compared with cells without the inhibitor (Fig. 8A). Nevertheless, the distribution of the actin filaments (green) changed upon treatment with genistein. They were dispersed in the cytoplasm, while in untreated THP1 cells, actin filaments were mainly located near the cell membrane. There was no reduction in the signal derived from the internalization of VP6 nanotubes when J774 cells were pretreated with 50, 100 or 200 μ M genistein (Fig. 8E, F and G). The VP6 signal was similar to that observed in mock-treated cells (Fig. 8D). For J774 cells, the distribution pattern of the actin filaments remained the same whether or not the cells were preincubated with genistein.

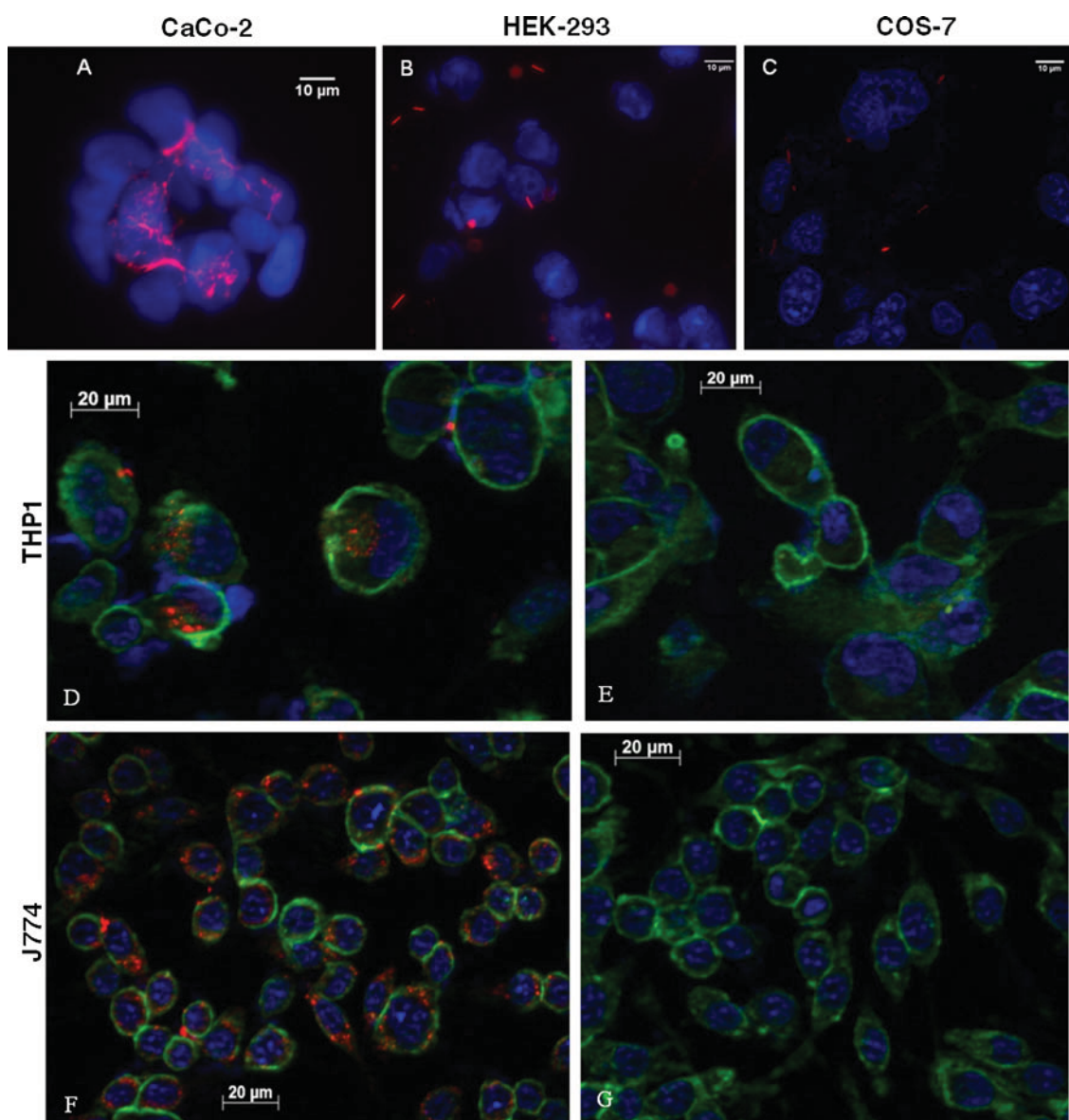


Fig. 4 Internalization of VP6 nanotubes by cells. Panels A, B and C show CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells, respectively. Panels D to G show THP1 or J774 macrophages. Cells in panels A, B, C, D and F were incubated for 4 h with 200 µL of a 150 µg/mL VP6 nanotube solution in serum-free medium. Cells from panels E and G were

incubated with serum-free medium. The presence of VP6 was detected with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat polyclonal anti-mouse antibody coupled to Alexa 594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). The actin cytoskeleton of macrophage cells (lower panels) was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

Discussion

VP6 nanotubes have been demonstrated to be excellent immunogens and more efficient at providing protection from rotavirus challenge than dIRLP or trimers [14]. In order to understand this property, the interaction of VP6 nanotubes with cells of different lineages (myeloid, epithelial and fibroblasts-like) was evaluated in *in vitro* cultures. First, the cytotoxicity of nanotubes to cells of various lineages was analyzed. This is of interest, as tubular structures have been reported to be toxic to cells

[26–28]. VP6 nanotubes were not toxic to any of the cell lines tested here, even when it was shown that they interact with cells.

Further experiments evaluated the ability of cells to internalize VP6 nanotubes. The mechanism involved in the specificity of the cellular uptake of polymeric particles is not well defined, but it is known to depend on the shape and surface properties of the particles. VP6 nanotubes were only internalized by cell lines of myeloid origin, indicating that nanotube uptake was specific. Control experiments with dIRLP and denatured VP6 showed that uptake was

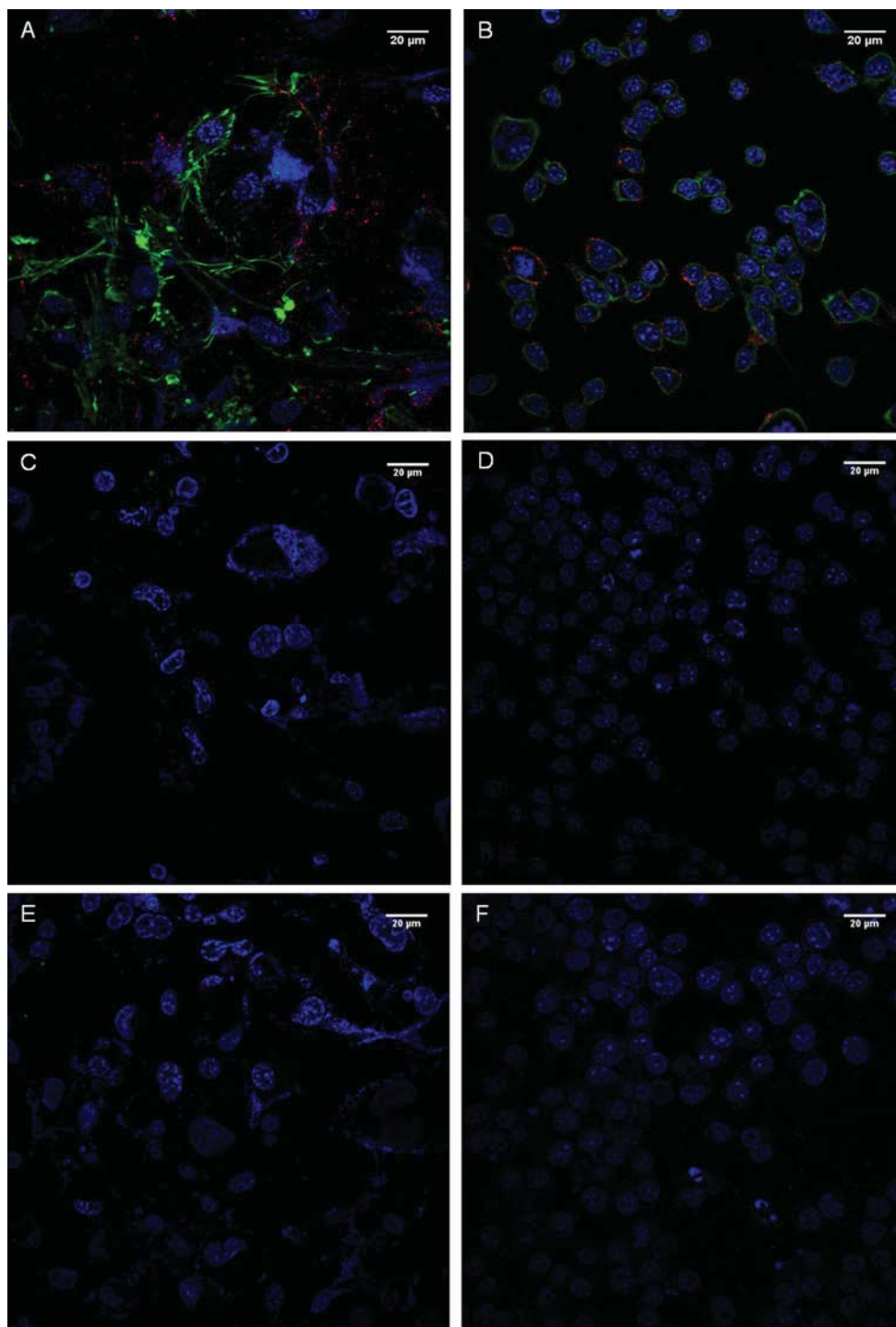


Fig. 5 Interaction of denatured VP6 or dIRLP with THP1 or J774 cells. A and B: THP1 and J774 cells, respectively, incubated with 200 μL of a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution of denatured VP6 for 4 h. The presence of VP6 was detected with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat polyclonal anti-mouse antibody coupled to Alexa

specific to nanotubes, as neither of the other forms of VP6 was internalized by macrophage cells. This indicates that the size and shape of VP6 nanotubes are essential features that determine their specific uptake by THP1 and J774

594 (red), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green). C and D: THP1 and J774 cells, respectively, incubated with 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of dIRLP for 4 h. dIRLP was visualized using the GFP label in VP2 (green). E and F: THP1 and J774 cells incubated with RPMI medium. Nuclei were stained with DAPI (blue)

cells. Similar results have been reported for OVA-conjugated beads of sizes ranging from 40 nm to 2 μm [29]. It was shown that larger beads are taken up preferentially by a macrophage-like subset of antigen-presenting cells. As

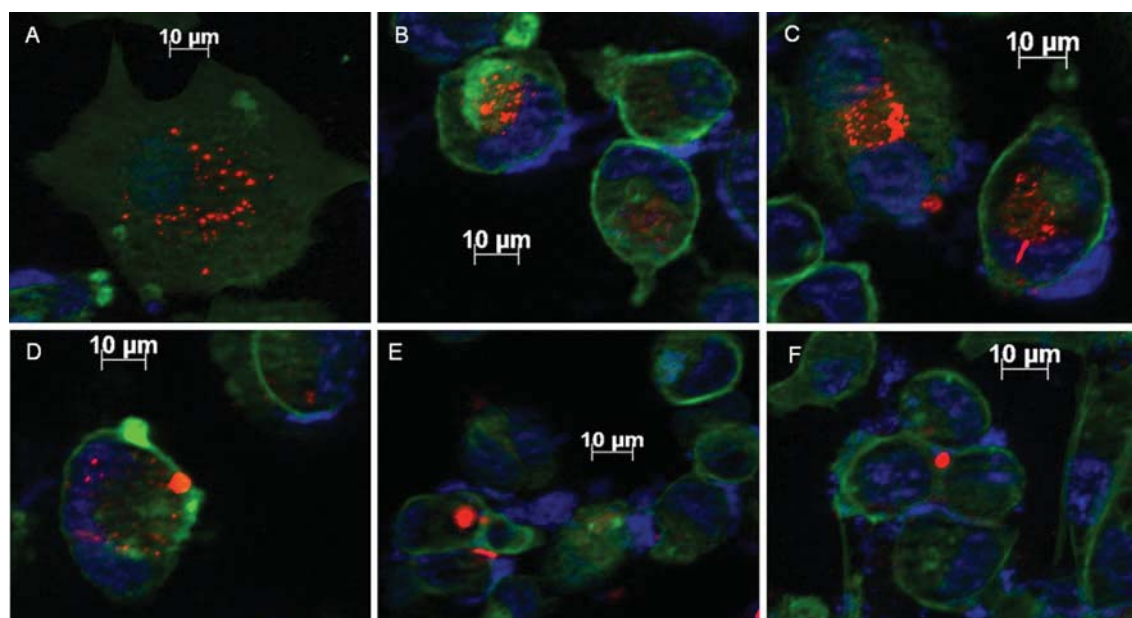


Fig. 6 Influence of M β CD on the internalization of VP6 nanotubes by THP1 cells. Cells were incubated for 2 hours with different concentrations of M β CD (A, 0; B, 0.312 mM; C, 0.625 mM; D, 1.25 mM; E, 2.5 mM; F, 5 mM) and then 200 μ L of a 150 μ g/mL solution of VP6 nanotubes was added to all wells and incubated for

another 4 h. The presence of VP6 inside cells was detected using an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa-594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

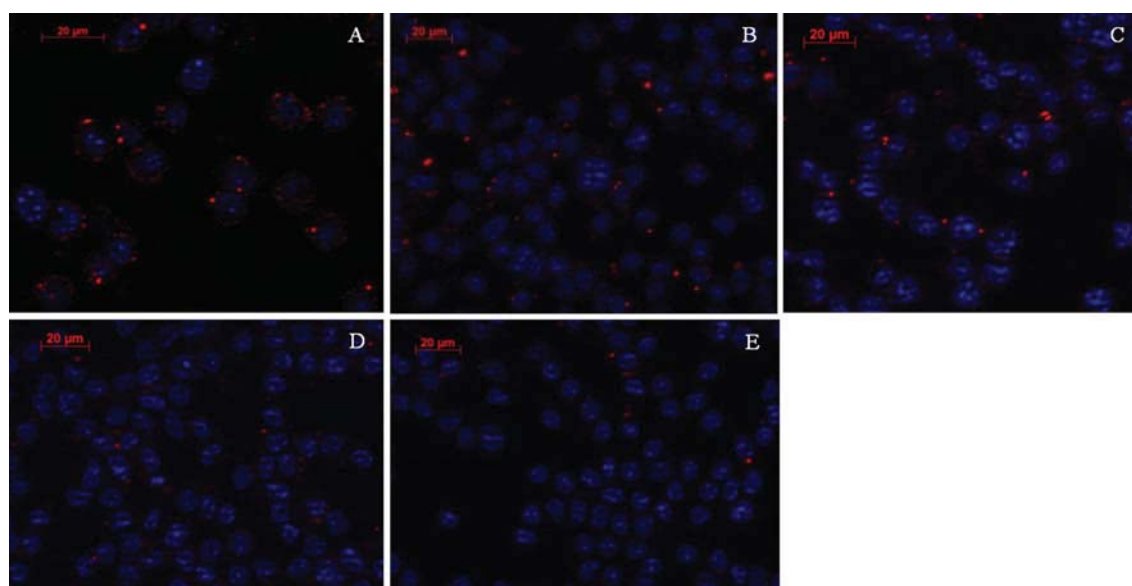


Fig. 7 Influence of M β CD on the internalization of VP6 nanotubes by J774 cells. Cells were preincubated for 2 h with different concentrations of M β CD (A, 0; B, 0.625 mM; C, 1.25 mM; D, 2.5 mM; E, 5 mM) and then 200 μ L of a 150 μ g/mL solution of VP6 nanotubes was added and incubated for another 4 h. VP6 internalized by cells was detected using fluorescence microscopy with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal

antibody coupled to Alexa-594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green). The green signal of the actin cytoskeleton is not shown because most of the VP6 signal co-localized with it. Images of the actin cytoskeleton signal are presented in Figure 2 of the online resources file

macrophages are important immune effector and regulator cells, our results can explain why the level of serum IgG raised against VP6 is higher in CD1 mice immunized with

VP6 nanotubes than in mice immunized with dIRLP, as well as the higher protection generated against rotavirus infection measured as a reduction of viral shedding [14].

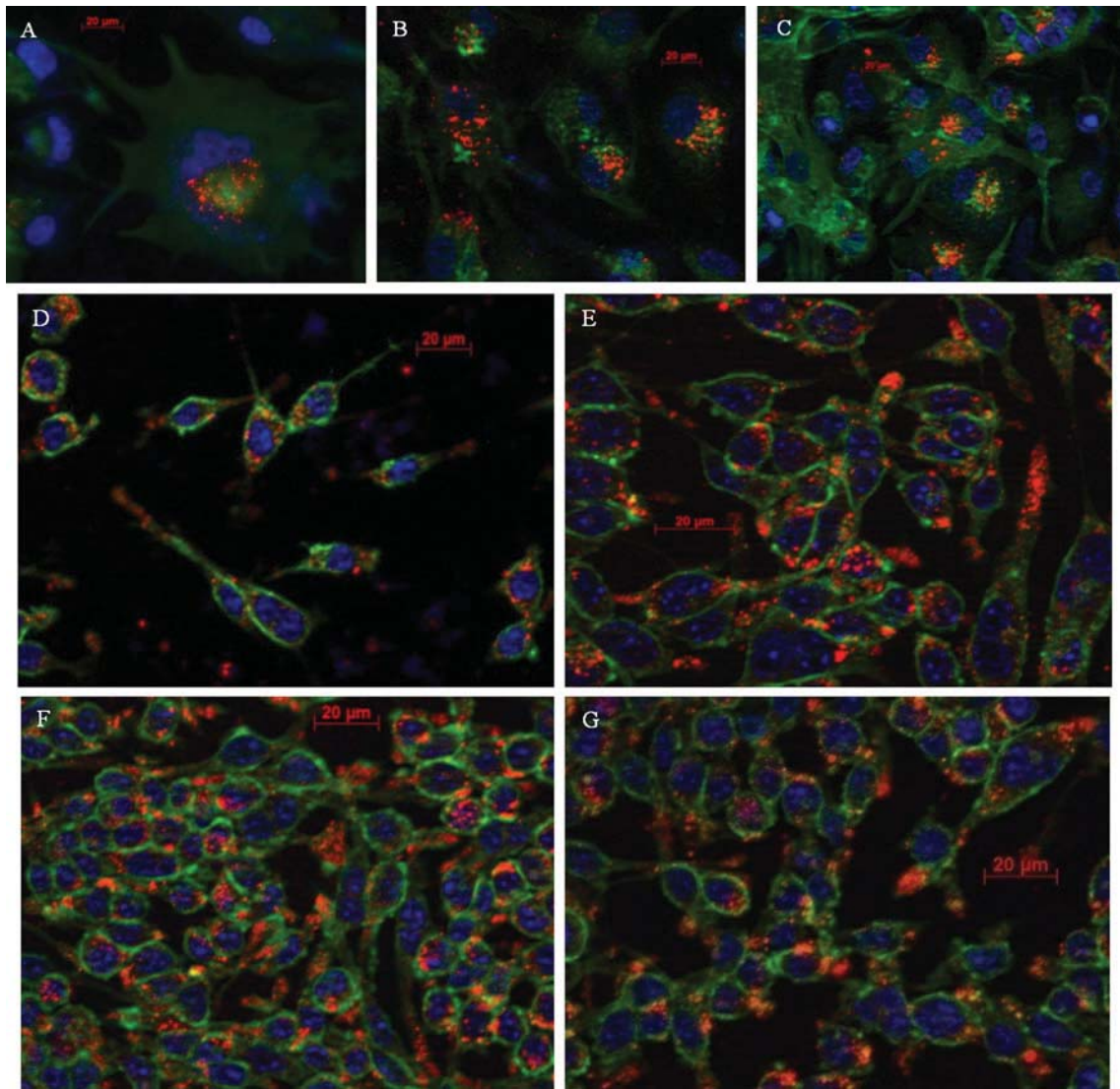


Fig. 8 Influence of genistein on the internalization of VP6 nanotubes in THP1 (panels A, B and C) and J774 (panels D, E, F and G) cells. Cells were incubated for 2 h with different concentrations of genistein (A and D, 0; B and E, 50 μ M; C and F, 100 μ M; G, 200 μ M) and then 200 μ L of a 150 μ g/mL VP6 nanotube solution was added and incubated for another 4 h. The presence of the nanotubes inside the

cells was detected using fluorescence microscopy with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa-594 (red). The nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

Macrophages, the only cell type that internalized VP6 nanotubes, are capable of phagocytosing large particles and cells, but the size of VP6 nanotubes may not be the only factor that controls their specific internalization by macrophages. The specificity of the cellular uptake of VP6 nanotubes into macrophages is possibly determined by their interaction with receptors located in the plasma membrane of the cell. The entry of particles into cells is mediated by endocytic mechanisms, and a single entity may use various uptake routes to enter cells [30]. Given the size of VP6 nanotubes, phagocytosis is probably the route for their internalization by macrophages. Gualtero et al. [31] proposed that VP6 interacts with the heat shock

cognate protein HSC70, which is involved in rotavirus entry into cells. HSC70 belongs to the HSP70 family, which plays key roles in the stimulation of the immune system. Triantafilou et al. [32] identified HSC70 and HSC90 as part of a multimeric receptor complex for bacterial lipopolysaccharides in innate immune cells. Also, HSC70 binds specifically to the surface of antigen-presenting cells and is spontaneously internalized by receptor-mediated endocytosis, allowing the cross-presentation of peptide antigens [33]. Members of the HSP70 family are located within lipid rafts in the plasma membrane of cells [34], and interaction with them may be disrupted by a decrease of cholesterol in the membrane, as observed here

when M β CD was used. Whether HSC70 protein is involved in the interaction of VP6 nanotubes with macrophages remains to be determined.

The two specific inhibitors tested here interfere with two different endocytic mechanisms. Cholesterol, extracted by M β CD, has pivotal roles in phagocytosis along with other components of the cellular membrane [35–37]. That M β CD inhibited entry of VP6 nanotubes into macrophages indicates that the presence of cholesterol in the plasma membrane of THP1 and J774 macrophages, and probably the grouping of certain receptors within lipid rafts, is required. In agreement with our results, Nagao and coworkers [38] reported that the addition of M β CD impaired the incorporation of polystyrene latex microspheres (3 μ m diameter) into J774 cells, indicating that microspheres were incorporated via lipid-raft-dependent phagocytosis. The influence of membrane cholesterol on the phagocytic capacity of J774 macrophages was also demonstrated by Gatfield and Peters [39]. Depletion of plasma membrane cholesterol resulted in a 85 to 90 % reduction of the uptake of *Mycobacterium bovis* BCG by J774 cells.

Although the inhibitory activity of the tyrosine kinase inhibitor genistein on endocytosis has not been fully characterized, it is proposed that it impairs the recruitment of dynamin II to the endocytosis site, which participates in the scission of the endocytic vesicles in clathrin-dependent and caveolae-dependent endocytosis [21]. It is possible that the size of VP6 nanotubes impaired their internalization by clathrin-coated vesicles (200 nm in size) or by caveolae (50–80 nm). Moreover, J774 cells do not express caveolin [40]. Therefore, it is not surprising that genistein did not affect VP6 nanotube uptake. The disperse state of the actin filaments observed in the cytoplasm of genistein-treated THP1 cells was probably due to a local disruption of the actin cytoskeleton. The addition of genistein disrupted the actin cytoskeleton in THP1 but not in J774 macrophages. The observation that VP6 nanotubes only entered macrophages and that the entry did not occur through clathrin-coated vesicles or through caveolae suggest that the tubular form of VP6 was taken up by macrophages.

This work contributes to our understanding of the high immunogenicity of VP6 nanotubes by providing information about their interaction with cells in culture. Our results suggest that the size of the immunogen and the spatial distribution of epitopes are relevant for the stimulation of antigen-presenting cells, as only VP6 nanotubes, and not dIRLP or denatured VP6, were taken up by macrophages.

Acknowledgements Financial support was provided by SEP-Conacyt 101847 and PAPIIT-UNAM IN223210 and IT200113. MR received financial support from Conacyt during her graduate studies. Technical support was provided by A. R. Pastor and V. Hernández and by G. Zavala and A. N. Lecona at the Electron Microscopy Units

of Instituto de Biotecnología UNAM and Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico, and J. A. Pimentel at the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM, México. Materials were provided by Dr. Y. Rosenstein, Dr. A. Valdez, and Dr. C. Treviño.

Conflict of interest The authors declare that they do not have any direct financial relationship with the commercial entities mentioned in this manuscript.

References

1. Wardlaw T, Salama P, Brocklehurst C, Chopra M, Mason E (2010) Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet* 375(9718):870–872. doi:10.1016/S0140-6736(09)61798-0
2. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013—Recommendations (2013). *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.037
3. Ward RL, McNeal MM, Steele AD (2008) Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag* 4(1):49–63
4. Esquivel FR, Lopez S, Guitierrez XL, Arias C (2000) The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Arch Virol* 145(4):813–825
5. Banos DM, Lopez S, Arias CF, Esquivel FR (1997) Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol* 71(1):419–426
6. Ward RL, McNeal MM (2010) VP6: a candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 202(Suppl):S101–S107. doi:10.1086/653556
7. Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J (2002) Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *J Virol* 76(16):8110–8117
8. Cortes B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H, Schwartz-Cornil I (2006) Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80(21):10692–10699. doi:10.1128/JVI.00927-06
9. McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Ward RL (2002) CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). *J Virol* 76(2):560–568
10. Smiley KL, McNeal MM, Basu M, Choi AH, Clements JD, Ward RL (2007) Association of gamma interferon and interleukin-17 production in intestinal CD4+ T cells with protection against rotavirus shedding in mice intranasally immunized with VP6 and the adjuvant LT(R192G). *J Virol* 81(8):3740–3748. doi:10.1128/JVI.01877-06
11. Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA (2001) Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *Embo J* 20(7):1498–1507. doi:10.1093/emboj/20.7.1498
12. Ready KFM, Sabara M (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology* 157(1):189–198
13. Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T (2011) Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine* 29(45):8126–8133. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.026
14. Pastor-Flores AR, Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel-Soto E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA (2013) The assembly conformation of rotavirus VP6 determines

- its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. Vaccine (in press)
15. Ghosh MK, Borca MV, Roy P (2002) Virus-derived tubular structure displaying foreign sequences on the surface elicit CD4+ Th cell and protective humoral responses. *Virology* 302(2):383–392 (pii:S004268220291648X)
 16. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J* 20(7):1485–1497. doi:10.1093/emboj/20.7.1485
 17. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* 2(4):249–255. doi:10.1038/nnano.2007.70
 18. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958–969. doi:10.1038/nri2448
 19. Plascencia-Villa G, Mena JA, Castro-Acosta RM, Fabian JC, Ramirez OT, Palomares LA (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromatogr B* 879(15–16):1105–1111. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.027
 20. Castro-Acosta RM, Revilla AL, Ramirez OT, Palomares LA (2010) Separation and quantification of double- and triple-layered rotavirus-like particles by CZE. *Electrophoresis* 31(8):1376–1381. doi:10.1002/elps.200900558
 21. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18(3):561–569. doi:10.1038/Mt.2009.281
 22. Greenberg HB, Valdesuso J, Vanwyke K, Midthun K, Walsh M, Mcauliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y (1983) Production and preliminary characterization of monoclonal-antibodies directed at 2 surface-proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47(2):267–275
 23. Mena JA, Ramirez OT, Palomares LA (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol* 122(4):443–452. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.005
 24. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
 25. Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramirez OT (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng* 104(5): 871–881. doi:10.1002/bit.22497
 26. Mrakovcic M, Absenger M, Riedl R, Smole C, Roblegg E, Frohlich LF, Frohlich E (2013) Assessment of long-term effects of nanoparticles in a microcarrier cell culture system. *Plos One* 8(2):e56791. doi:10.1371/journal.pone.0056791
 27. Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R (2012) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol Pharm* 9(4):708–717. doi:10.1021/mp200419b
 28. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP (2007) Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159:1–77. doi:10.1007/112_2007_0701
 29. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173(5):3148–3154 (pii:173/5/3148)
 30. Jones AT (2008) Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm* 354(1–2):34–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.046
 31. Gualtero DF, Guzman F, Acosta O, Guerrero CA (2007) Amino acid domains 280–297 of VP6 and 531–554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Arch Virol* 152(12):2183–2196. doi:10.1007/s00705-007-1055-5
 32. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL (2001) A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2(4):338–345. doi:10.1038/86342
 33. Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H (1999) Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162(7):3757–3760
 34. Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10):5813–5818. doi:10.1073/pnas.0631608100
 35. Yeung T, Grinstein S (2007) Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 219:17–36
 36. Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151(7):1353–1367
 37. Falkenburger BH, Jensen JB, Dickson EJ, Suh BC, Hille B (2010) Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J Physiol London* 588(17):3179–3185. doi:10.1113/jphysiol.2010.192153
 38. Nagao G, Ishii K, Hirota K, Makino K, Terada H (2010) Role of lipid rafts in phagocytic uptake of polystyrene latex microspheres by macrophages. *Anticancer Res* 30(8):3167–3176
 39. Gatfield J, Pieters J (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288(5471):1647–1650
 40. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De-novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of Vip21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19):8655–8659